



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, 15/29, A01H 1/02, 5/00, 5/10</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/15678</b>
			(43) Date de publication internationale: 1er avril 1999 (01.04.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02042 (22) Date de dépôt international: 23 septembre 1998 (23.09.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/11812                      23 septembre 1997 (23.09.97)      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DROUAUD, Jan [FR/FR]; 7, rue du Général Leclerc, F-78000 Versailles (FR). FOURGOUX, Agnès [FR/FR]; Chemin des Quatre Arpents, F-78330 Fontenay Le Fleury (FR). PELLETIER, Georges [FR/FR]; 28, avenue de l'Espérance, F-91440 Bures sur Yvette (FR). GUERCHE, Philippe [FR/FR]; 7, rue Marceau, F-92170 Vanves (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: MICROSPORE-SPECIFIC PROMOTER AND METHOD FOR OBTAINING HYBRID PLANTS			
(54) Titre: PROMOTEUR SPECIFIQUE DES MICROSPORES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES HYBRIDES			
(57) Abstract			
The invention concerns a microspore-specific promoter and its use for obtaining plants with gametophytic male sterility with inducible fertility. It also concerns a method for obtaining hybrid plants.			
(57) Abrégé			
L'invention concerne un promoteur spécifique des microspores ainsi que sa mise en oeuvre pour obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible. Elle concerne également un procédé d'obtention de plantes hybrides.			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PROMOTEUR SPECIFIQUE DES MICROSPORES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES HYBRIDES

La présente invention concerne notamment un promoteur spécifique des  
5 microspores et un procédé d'obtention de plantes hybrides.

La microspore correspond à un stade précis du développement du gamète mâle chez les plantes supérieures. La gamétogenèse mâle a lieu dans un organe spécialisé, l'anthere, et comprend *sensu stricto* la différenciation de cellules diploïdes en grains de pollen haploïdes. Chaque cellule diploïde appelée cellule  
10 sporogène subit une méiose pour produire quatre microspores haploïdes qui se différencient par la suite pour donner des grains de pollen matures.

Connaître et savoir manipuler les facteurs moléculaires qui contrôlent le développement de la microspore est un enjeu considérable non seulement d'un point de vue de la recherche fondamentale mais aussi d'un point de vue de  
15 l'amélioration des plantes. En effet, cette connaissance permet de maîtriser la production de grains de pollen et par conséquent la reproduction de la plante.

Une telle maîtrise passe par l'obtention de plantes totalement stériles pour l'un de leur gamète de façon à empêcher l'autofécondation.

Jusqu'à présent, la stérilité mâle des plantes, moins complexe que la  
20 stérilité femelle, a été largement étudiée mais nécessite l'utilisation de systèmes génétiques relativement lourds à mettre en œuvre pour la production commerciale de semences hybrides. Un type de stérilité mâle très utilisée est la stérilité mâle cytoplasmique qui consiste en l'obtention :

- d'une lignée femelle dont le caractère mâle-stérile est transmis par le  
25 cytoplasme ; on appelle un tel cytoplasme un "cytoplasme inducteur de stérilité mâle" ; ces "cytoplasmes inducteurs" pour une espèce donnée sont en général soit découverts dans la nature, soit observés parfois chez des plantes résultant de croisements interspécifiques (fécondation croisée, fusion de protoplastes etc...),

- d'une lignée "mainteneuse" de stérilité dont le cytoplasme est normal, et
- d'une lignée restauratrice de fertilité si l'on récolte les graines et/ou les fruits de la plante hybride.

5 Dans la lignée femelle (porteuse du cytoplasme inducteur de stérilité) tous les grains de pollen sont tués. Il est donc nécessaire pour multiplier et améliorer cette lignée de disposer d'une lignée ne portant ni le cytoplasme inducteur (donc produisant des grains de pollen) ni le gène de restauration. Cette lignée est dite "mainteneuse" de stérilité car le croisement avec la lignée femelle donne une  
10 descendance entièrement femelle.

La restauration de la fertilité est réalisée dans l'hybride par le croisement du parent femelle (portant le cytoplasme mâle stérile) avec le parent comprenant un gène nucléaire de la restauration (la lignée restauratrice), ce croisement permettant l'obtention de plantes hybrides fertiles qui produiront des graines par  
15 autofécondation.

Dans le cas de la stérilité nucléaire sporophytique, il a été décrit, par exemple, des systèmes permettant de tuer les cellules mères des microspores au moyen d'une RNase et par conséquent d'obtenir des plantes dépourvues de gamètes mâles. La fertilité est restaurée au moment du croisement de la lignée ne  
20 produisant plus de gamètes mâles avec une autre lignée portant un inhibiteur de la RNase, les graines résultant de ce croisement comprenant à la fois le gène cytotoxique et son inhibiteur.

La présente invention propose quant à elle d'obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique et incapables de produire des grains de pollen.  
25 Elle consiste à mettre en œuvre une région promotrice contrôlant l'expression spécifiquement dans les microspores d'un gène codant pour une molécule cytotoxique tout en disposant d'un moyen permettant l'inhibition contrôlée de cette toxicité afin d'obtenir une lignée de plantes génitrices homozygotes totalement stériles quant à leurs gamètes mâles et ensuite obtenir des plantes

hybrides fertiles (produisant un grain de pollen viable sur deux), donc capables de produire des graines, sans avoir recours à l'utilisation d'un gène de restauration de la fertilité.

Jusqu'à présent, un seul gène s'exprimant spécifiquement dans la  
5 microspore a été décrit chez le tabac (Oldenholf et al., 1996). Ce gène ne possède pas d'homologue chez les Brassicacées comme cela résulte d'une expérience de Southern blot sur de l'ADN génomique de *Brassica oleracea* (données non montrées).

La présente invention a donc pour objet une séquence nucléotidique dont il  
10 a été démontré que le gène correspondant s'exprime spécifiquement dans la microspore, cette séquence nucléotidique correspond à SEQ ID N° 3.

Par conséquent, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :

- a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
- 15 b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
- c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).

Dans le cadre de la présente invention, la partie la plus intéressante de  
cette séquence nucléotidique est la région promotrice définie comme étant la  
séquence précédant (côté 5') le codon de début de traduction (ATG). Cependant,  
20 au stade actuel des connaissances de la séquence nucléotidique selon SEQ ID N° 3, trois ATG ont été mis en évidence. Un en position 1965, un autre en position 2085 et un troisième en position 2112. Il semblerait que l'ATG fonctionnel soit celui situé en position 2085. Ceci n'est cependant pas confirmé, c'est la raison pour laquelle la plus grande région promotrice envisageable concernant SEQ ID  
25 N° 3 s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 2111 et préférentiellement du nucléotide 1 au nucléotide 2084.

Cette région promotrice précède donc, à l'état naturel, une séquence codante (orf) qui est exprimée spécifiquement dans les microspores et dans le cas où cet orf est remplacé (par manipulation génétique) par un autre orf dont le

produit est une molécule cytotoxique, cette dernière est susceptible de ne détruire que lesdites microspores.

La présente invention a donc également pour objet des vecteurs d'expression cellulaire comprenant une séquence promotrice telle que ci-dessus

5 décrite placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.

Avantageusement, le produit cytotoxique en question est une protéase. En effet, lorsque la protéase s'exprimera spécifiquement dans les microspores, elle en détruira toutes les protéines, ce à quoi la microspore ne pourra pas survivre.

10 Préférentiellement, la protéase est une subtilisine et en particulier la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*. Cette subtilisine BPN' fait partie de la famille des subtilisines que l'on trouve chez de nombreux organismes et qui sont des protéases connues pour couper les protéines au niveau des sérines.

Il s'agit donc d'introduire un vecteur conforme à l'invention dans une  
15 souche bactérienne susceptible de réaliser la transformation de cellules de plantes telle qu'*Agrobacterium tumefaciens*. Ceci peut notamment être réalisé par la méthode d'infiltration de plantes d'*Arabidopsis thaliana* décrite par Bechtold et al., 1993. Cette technique consiste à introduire la bactérie dans les cellules des hampes florales par infiltration sous vide. Les plantes sont ensuite repiquées en  
20 serre et leur graines récoltées. Environ une graine sur mille donnent naissance à des plantes dont toutes les cellules portent le transgène. La transformation d'autres plantes, et notamment du colza, peut être réalisée par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* et/ou *Agrobacterium rhizogenes* à l'aide de diverses techniques, maintenant classiques (transformation de disques foliaires,  
25 d'hypocotyles, de hampes florales etc...) associant une phase de coculture de la bactérie avec les tissus végétaux, suivie de la sélection et de la régénération des cellules transformées en plantes entières. D'autres techniques de transformation ne font pas intervenir cette bactérie et permettent de transférer directement le gène cloné dans des cellules ou des tissus (electroporation, canon à particules etc...) et

de sélectionner et d'obtenir des plantes transformées (revue par Siemens and Schieder).

La présente invention a également pour objet les cellules de plantes transformées par un vecteur conforme à l'invention ainsi que des plantes  
5 comprenant lesdites cellules.

L'invention a également pour objet des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.

Comme indiqué précédemment, la présente invention permet donc  
10 l'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique inhibant toute production de grains de pollen. Cependant, ces plantes homozygotes quant à leur stérilité mâle ne peuvent être obtenues qu'après autofécondation de plantes préalablement transformées par un vecteur conforme à l'invention, c'est-à-dire hémizygotes quant à leur stérilité mâle et chez lesquelles on a restauré  
15 provisoirement la fertilité des grains de pollen porteurs de la stérilité gamétophytique pour leur permettre de réaliser une autofécondation.

Un moyen d'obtenir des plantes homozygotes pour ce gène serait d'utiliser la gynogenèse, technique qui consiste à régénérer des plantes haploïdes doublées à partir de culture d'ovules ou d'ovaires. Il s'agit dans ce cas d'obtenir la formation  
20 d'une plante homozygote diploïde à partir du gamète femelle haploïde. La gynogenèse est applicable à un certain nombre d'espèces végétales mais il n'est pas envisageable de produire un grand nombre de plantes homozygotes pour le transgène en question par cette technique, car sa mise en œuvre est délicate et son efficacité reste le plus souvent très faible.

25 La présente invention concerne également un procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :

- l'insertion dans des plantes de lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et

- l'obtention des plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

Plus particulièrement, le procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible conforme à l'invention comprend les étapes de :

- 5 a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention,
- b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la cytotoxicité du produit,
- c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
- 10 d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
- e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).

Ainsi, à l'étape a) du procédé ci-dessus, on transforme une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention c'est-à-dire comprenant une séquence  
15 promotrice spécifique des microspores placée en amont d'un gène codant pour un produit cytotoxique. Les plantes résultant de cette transformation comprennent toute l'ADN en question dont le gène ne s'exprime que dans les microspores. Cependant, à ce stade, la plante étant diploïde au moment de la transformation, elle devient hétérozygote quant à sa stérilité mâle et n'est donc capable, après  
20 transformation, de donner lieu qu'à 50 % de microspores viables (les 50 % autres étant détruits suite à l'expression du transformant).

A l'étape b), la restauration ou l'induction de la fertilité perdue par la plante transformée est donc ensuite réalisée par l'inhibition de la toxicité du produit du gène transformant.

25 Ceci peut se faire de diverses manières, cependant, dans le cas où le produit cytotoxique en question est une subtilisine et en particulier, la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*, l'inhibition est réalisée par l'action sur la plante transformée d'une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés (n'ayant donc *a priori* pas d'action sur les plantes). En effet, cette molécule



appliquée durant l'anthèse, est susceptible de restaurer la fertilité totale des plantes hémizygotes par inhibition de la subtilisine. Elle peut par exemple être appliquée au pied de la plante et atteindre tous les tissus. Comme un insecticide, elle ne devrait avoir aucun effet sur la plante, cependant, elle jouera son plein effet au  
5 niveau des microspores, seuls organes exprimant la subtilisine.

Ensuite, à l'étape c), on procède à l'autofécondation des plantes dont la fertilité a été restaurée puis, à l'étape d), on sélectionne les plantes homozygotes quant à la stérilité mâle et par conséquent totalement stériles en l'absence de traitement c'est-à-dire d'inhibition du produit cytotoxique.

10 Les plantes ainsi obtenues, incapables de produire des gamètes mâles mais toujours capables de produire des gamètes femelles, c'est-à-dire des ovules, peuvent donc être croisées avec une autre lignée de plantes totalement fertiles et présentant des caractéristiques agronomiques intéressantes. Dans ce croisement, la plante homozygote quant à la stérilité mâle joue le rôle de parent femelle tandis  
15 que l'autre plante joue le rôle de parent mâle. L'hybride résultant de ce croisement est hémizygote quant à la stérilité mâle et est donc susceptible de produire 50 % de grains de pollen viables (les autres portant le transgène sont donc détruits par le produit cytotoxique). Une production de 50 % du pollen est amplement suffisante pour donner lieu à des graines présentant les qualités de chacune des lignées  
20 croisées que l'on cherchait précisément à associer.

La présente invention concerne donc également un procédé d'obtention de plantes hybrides caractérisé en ce qu'il comprend le croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique comme ci-dessus décrit avec des plantes de lignée B d'intérêt agronomique. Elles concernent également  
25 les graines issues des plantes hybrides ainsi obtenues.

Avantageusement, les plantes conformes à l'invention appartiennent à la famille des Brassicacées ; préférentiellement, il s'agit du colza.

Par ailleurs, il est à souligner que la région promotrice conforme à l'invention peut également être mise en œuvre dans des stratégies d'inactivation de

gène par utilisation d'éléments mobiles tels que les transposons et rétrotransposons.

En effet, ceci peut être réalisé dans le but d'isoler des plantes présentant un génotype mutant stable et d'isoler de très nombreux mutants différents et  
5 indépendants.

Il s'agit de créer une séquence chimérique constituée d'une région promotrice conforme à l'invention et de la séquence, en tout ou partie, d'un élément mobile. L'expression de cet élément mobile, réduite à la phase de développement de la microspore, devrait permettre d'induire quelques mutations  
10 dans le génome des grains de pollen de la plante transformée. Il est alors possible, dans la descendance obtenue à partir de ces grains de pollen, d'isoler des individus ne portant plus le transgène mais seulement une ou plusieurs mutations issues de phénomènes de transposition. Le principe est de provoquer, grâce à la susdite région promotrice, l'activation de la transposition de ces éléments mobiles pendant  
15 un temps très court (la microsporogénèse) dans une multitude de cellules gamétiques et supprimer à la génération suivante les plantes qui portent le transgène (à savoir la région promotrice + la séquence permettant l'activation de la transposition) de façon à ce que le cycle ne recommence pas. Il s'agit ensuite de rechercher, dans la descendance et par divers techniques, les plantes pour  
20 lesquelles les éléments mobiles ont provoqués des mutations en s'insérant dans les gènes. L'étude de ces plantes permettrait notamment de comprendre la fonction du gène muté.

Parmi les éléments mobiles susceptibles d'être ainsi utilisés, on peut citer les rétrotransposons de types Tnt1, Tto1, Tnp-2, Tos10-17, Bs1, BARE-1, Ta-1,  
25 etc... ou les transposons de type Ac/Ds, Spm, Mu, etc...

La figure 1 illustre l'alignement des séquences des deux ADNc M3 (SEQ ID N° 1) et M3.21 (SEQ ID N° 2) issues des criblages de la banque ADNc de microspore de *Brassica napus* cv.Brutor. Les codons de début (ATG) et de fin (TGA) de la séquence codante putative sont soulignées.

La figure 2 donne la séquence nucléotidique du clone BnM3.4 (SEQ ID N° 3) dont l'ADNc de M3 serait issu. L'ATG en gras (position 2085) est celui qui a la plus forte probabilité d'être l'ATG fonctionnel. L'ATG souligné en position 2112 est celui qui est présent dans la séquence de l'ADNc de M3.21. L'ATG souligné en position 1965 est le premier ATG rencontré. La séquence précédant ces ATG est considérée par conséquent comme la région promotrice du gène BnM3.4.

La figure 3 illustre l'hybridation de type Northern blot avec la sonde M3 marquée au  $^{32}\text{P}$  sur des ARN totaux (10  $\mu\text{g}$  par puits) extraits de différents tissus de colza. A : boutons de 0-2 mm (méiocytes) ; B : boutons de 2-3 mm (microspores uninucléées) ; C : boutons de 3-4 mm (microspores binucléées) ; D : boutons supérieurs à 4 mm (grains de pollen matures) ; E : sépales de colza ; F : pistils de colza ; G : boutons de colza mâle stérile ; H : boutons entiers de colza.

La figure 4 illustre la préparation du plasmide pJD51 de 7152 pb à partir du plasmide pAF1 de 5 135 pb (plasmide d'origine : pBluescript SK- PROMEGA) et du plasmide pBnB2 de 5458 pb (plasmide d'origine pBS SK- PROMEGA).

La figure 5 illustre la préparation du plasmide pJD101 de 19670 pb à partir du plasmide pEC2 de 15400 pb dérivé du plasmide pDHB 321.1, (D. Bouchez, communication personnelle) et du plasmide pJD51 (cf figure 2).

La figure 6 représente un schéma de sélection de variétés hybrides d'une plante (colza par exemple) faisant appel à un système de stérilité mâle gamétophytique avec induction de la fertilité. SMGfi : stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible ; Induction F : induction de la fertilité ; AF : autofécondation.

L'invention ne se limite pas à la seule description ci-dessus, elle sera mieux comprise à la lumière des exemples ci-après qui ne sont cependant donnés qu'à titre purement illustratif.

**EXEMPLE 1 : Mise en évidence d'un promoteur spécifique des microspores**

La première étape a consisté en l'obtention de clones d'ADN complémentaires (ADNc) exprimés spécifiquement dans la microspore de colza. Pour cela, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARN messagers (ARNm) de microspores de colza. Parallèlement, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm de boutons floraux de colza mâles stériles. Les ADNc provenant desdits boutons floraux ont été soustraits des ADNc dérivés des ARNm exprimés dans la microspore de colza. Les molécules résultant de cette soustraction ont été utilisées lors d'une expérience d'hybridation différentielle d'une banque d'ADNc de microspore selon une technique similaire à celle présentée par Atanassov et al. (1996).

L'un de ces clones isolés, l'ADNc M3 (SEQ ID N° 1) s'est avéré être le représentant d'un ARNm spécifiquement exprimé dans la microspore de colza. Un autre ADNc, nommé M3.21 (SEQ ID N° 2) a été trouvé par criblage de la banque avec l'ADNc M3. Les séquences de ces deux ADNc présentent 89 % d'identité (figure 1), ils sont issus visiblement d'une famille de gènes très proches, exprimés spécifiquement dans la microspore.

Le clone d'ADNc M3 a servi de sonde pour cribler une banque d'ADN génomique de colza commercialisée par CLONTECH Laboratories, Inc., 4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303-4607, USA ; deux clones (BnM3.4 et BnM3.2) correspondants à deux gènes différents ont été isolés. L'ADNc M3 serait issu du gène BnM3.4 (SEQ ID N° 3) car celui-ci porte un orf identique à l'ADNc M3 (figure 2). Ce gène ne possède pas d'intron. Suffisamment de résultats expérimentaux laissent à penser que l'ADNc M3.21 ne serait pas issu du deuxième gène isolé (BnM3.2) qui porte bien une région correspondant à la séquence de l'ADNc M3.21, mais à un troisième gène, très proche du gène BnM3.2.

La région promotrice de ce gène est définie comme étant la séquence immédiatement en amont du codon de début de traduction (ATG).

**EXEMPLE 2 : Vérification de la spécificité du promoteur du gène BnM3.4**

#### A/ Northern blot

Une analyse par Northern blot a été effectuée avec 10 µg d'ARN total de sépales, de pistil, de boutons entiers, de boutons de plante mâle stérile, de méiocytes, de microspores, de grains de pollen binucléés et de grains de pollen trinucléés, hybridés avec l'ADNc M3. Une bande de 1 kb correspond au transcrit du gène BnM3.4 et aussi au transcrit M3.21, puisqu'ils ont des séquences très proches. Ces transcrits sont uniquement présents dans les deux premiers stades de la gamétogenèse mâle dont les produits sont difficiles à isoler parfaitement de façon expérimentale (figure 3).

Les protéines déduites de ces deux clones d'ADNc sont évidemment très proches et sont riches en glycine et proline. Elles ne sont strictement identiques à aucune autre protéine des banques de données mais interviennent certainement dans la constitution de la paroi.

#### B/ Transformation par un gène chimérique

Différents gènes chimériques (c'est-à-dire constitués de la séquence codante d'un gène connu précédée de la région promotrice conforme à l'invention) ont été construits afin d'étudier la spécificité spatio-temporelle du promoteur de BnM3.4.

La figure 4 présente la construction d'un vecteur bactérien pJD51 associant un fragment du promoteur BnM3.4 avec la séquence codante du gène de la  $\beta$ -glucuronidase. Le plasmide pAF1 contenant la séquence codante de  $\beta$ -glucuronidase et la séquence de terminaison de transcription du gène NOS d'*Agrobacterium tumefaciens* a été digéré par les enzymes BamHI et ClaI. Le plasmide pBnB2 contient un fragment BamHI-BamHI de 6 kb issu du clone d'ADN génomique BnM3.4 et dans lequel est présent le gène BnM3.4. Un fragment correspondant à la plus grande région promotrice possible compte tenu des sites de restriction (2056 pb) a été isolé du plasmide pBnB2 par une double digestion BamHI-NspV et inséré entre les sites BamHI et ClaI (compatible avec NspV) du plasmide pAF1.

Le gène chimérique ainsi construit a été isolé par une digestion NotI du plasmide pJD51 pour être cloné dans un plasmide binaire d'*Agrobacterium tumefaciens* : pEC2 ouvert par l'enzyme NotI (figure 5).

Le plasmide binaire pJD101 contenant le gène chimérique a été introduit  
5 dans la souche C58C1 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al. 1986) par électroporation et les transformants possédant le pJD101 ont été sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine. Un de ces transformants d'*Agrobacterium* a été utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilevskja) par la méthode d'infiltration des hampes florales décrite par  
10 Bechtold et al. 1993. Les plantes transformées sont sélectionnées grâce à leur résistance à la phosphinothrycine, conférée par un gène de résistance inséré conjointement dans l'ADN-T.

Parmi ces plantes, certaines présentent une expression de la  $\beta$ -glucuronidase spécifiquement dans les microspores (mis en évidence par une  
15 coloration bleue lors de l'ajout d'un substrat spécifique de la  $\beta$ -glucuronidase, le X-Glu). Aucune coloration n'est présente dans les tissus adjacents de l'anthere de même que dans les tissus somatiques de la plante. Chez une plante transformée hémizygote pour le gène chimérique, la moitié des microspores produites sont bleues car elles seules contiennent le gène chimérique.

20 La spécificité d'expression conférée par cette séquence promotrice de 2 kb est bien restreinte, dans les limites de la sensibilité de la technique, à un seul type cellulaire et à partir du stade microspore.

**REFERENCES**

- 5     Atanassov I et al. (1996) Plant Science 118, 185-194.
- Bechtold N. et al (1993) Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences 316,  
      1194-1199
- 10    Koncz et al. 1986) Molecular General Genetics 204, 383-396
- Mariani et al. Nature 347(1990) 737-741.
- Oldenholf M.T. et al. (1996) Plant Molecular Biology 31, 213-225
- 15    Siemens and Schieder 1996. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2, 66-75

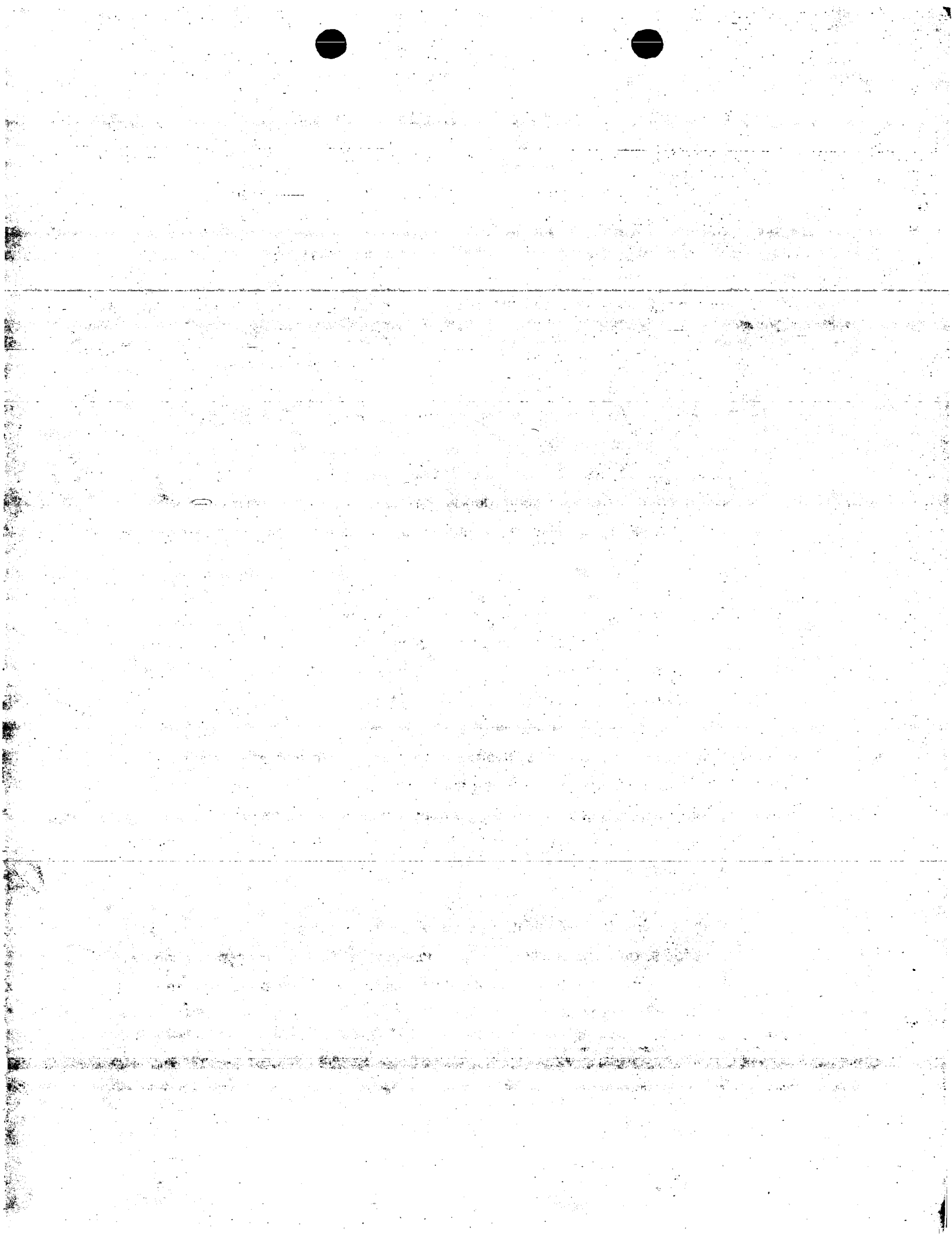
### REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :
  - a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
  - 5 b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
  - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 correspondant à tout ou partie :
  - 10 a) de la séquence s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 2111, de préférence du nucléotide 1 au nucléotide 2084 de SEQ ID N° 3, ou
  - b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
  - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
- 15 3. Vecteur d'expression cellulaire comprenant une séquence selon la revendication 2 placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.
4. Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le produit  
20 cytotoxique est une protéase et de préférence une subtilisine.
5. Cellules de plante transformées par un vecteur selon la revendication 3 ou 4.
6. Plantes comprenant des cellules selon la revendication 5.
- 25 7. Plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.
- 30 8. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :



- l'insertion dans des plantes d'une lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et
- l'obtention de plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

- 5 9. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 8 comprenant les étapes de :
- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur selon la revendication 3 ou 4,
  - b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la
  - 10 cytotoxicité du produit,
  - c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
  - d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
  - e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).
- 15
10. Procédé d'obtention de plantes selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que, dans le cas où le produit cytotoxique est une subtilisine, l'induction de la fertilité consiste à appliquer à la plante une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés.
- 20
11. Graines issues des plantes hybrides obtenues par croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 7 ou tel qu'obtenues par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 8 à 10 avec des plantes de lignée B d'intérêt
- 25 agronomique.
12. Plantes selon la revendication 7 ou obtenues par la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendication 8 à 10, caractérisées en ce qu'elles appartiennent à la famille des Brassicacées et de préférence en ce
- 30 qu'il s'agit de colza.



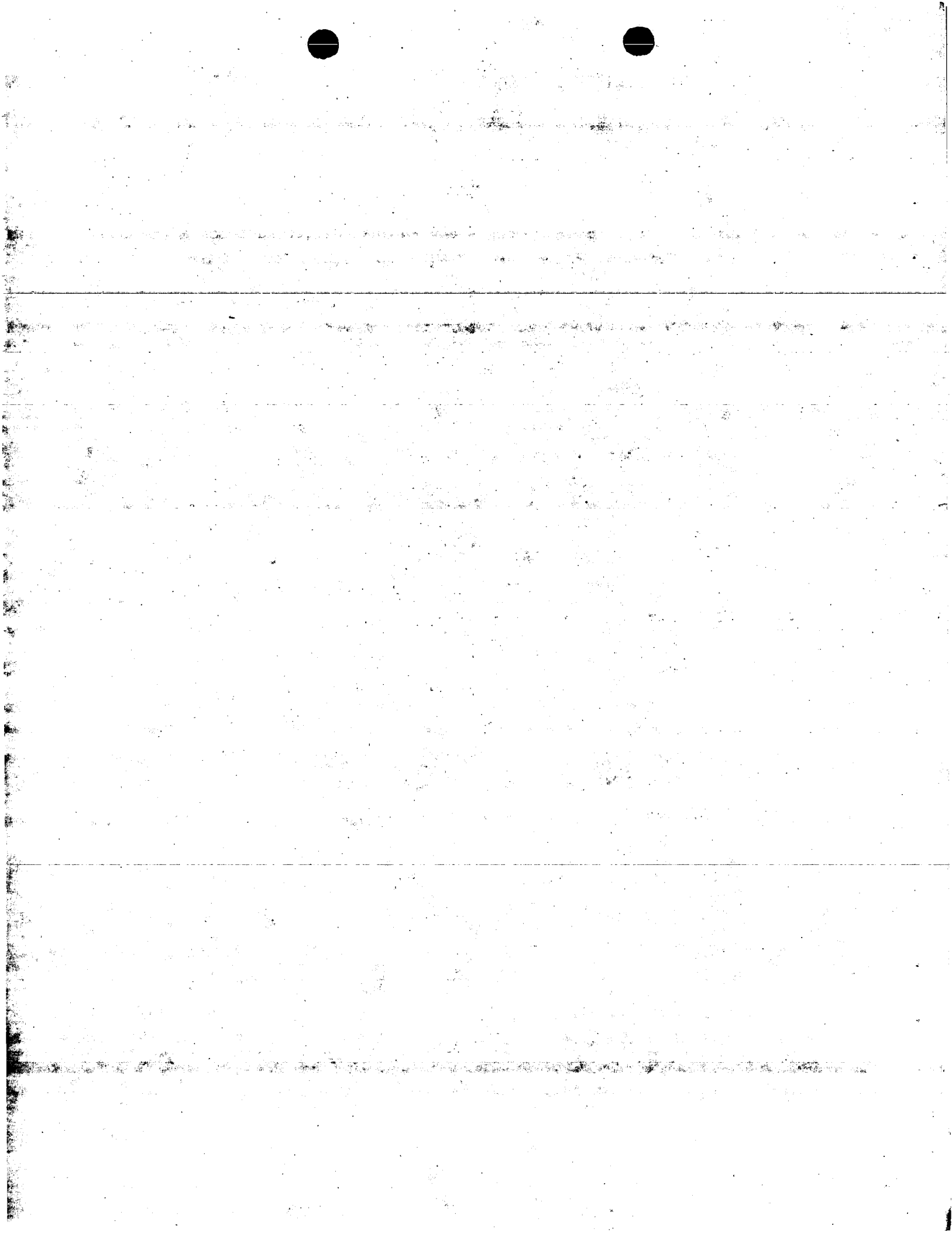
[illegible]

FIGURE 1



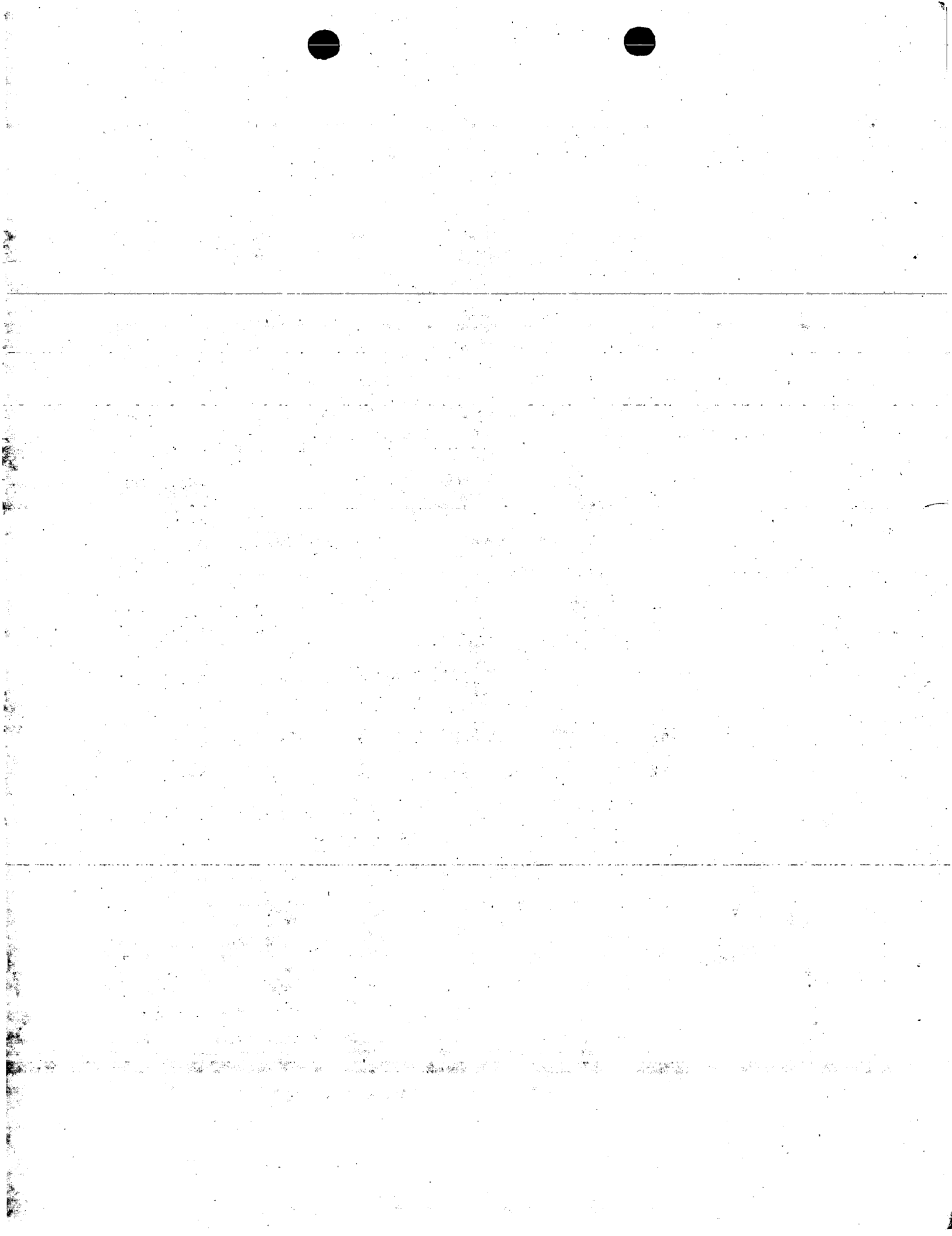
FIGURE 2

1 GGATCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTCCTAC CTCATAAAT  
51 ATATATTTGT TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAATCCTT TAGCTCAATG  
101 GTATAAATGT TGTGTTTGTAG ATTTCAATAA CCCGGGTTTCG AGTCATAGAC  
151 TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAAAGTGG AACGCACATA TCGCTGACGT  
201 GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG ATTTAAAAGT  
251 GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT  
301 ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCTTT TTAAATCTTA ATAATAATAC  
351 CAGNGCTTTT ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT  
401 CTTTTTTTTT GANCCGTTGA TTGGTTTATG CTTATTTGAA TGTNGCCNAC  
451 GTAAGAAATG AAGAACAATT TATATTTGGA GAAAATATAA TTTAATATGT  
501 TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA TGGATGCGAG  
551 TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCTTTTCT CAAAAAGTAA  
601 AATATTTGAT ATGTAACCTTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAATTA  
651 AATCAAAAATA GAAAAAACTG ATAGTGATCT ACCCTTCAAC GTTTTGAAC  
701 TATTCTTGGT TCACCCCTTA AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAATTT  
751 CATTATTGCA TATTCTATAT CTTTGTAGAA GTGAAACAAA ATATTATCAA  
801 GTTATATTAT GTTTTTCAAA TAAAAAGATA AAAAAATAAT AAAAAATAAT  
851 AGTAGTTACA AAAAAAAAAA ATTAATATTT TTACCAGCGT CANAAAAACAC  
901 TAAAACCTAA ACCCTAAATA TTAAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTTG  
951 GATAAATCTT AAACATTAAA CATTAAAACA CTAAACCCTA AATCCTAAAC  
1001 TCTAAACCCT TAAGTGTTTA AATGTTTAGT GTTTTTGATT TATAGTTTAG  
1051 GATTTATCCA AAGGTTTAAG GTTTACCCAA GAGTTTATGG TTTAGGGATT  
1101 ATGACTTAGG ATTTAGTGTT TTAGTGACGA CGTTCAAAGT ATTTTTTAAA  
1151 AAATATTTTT TTTGTAACAA CTACTATTTT TATTTATTTT TTTACCTTTT  
1201 TATATTAAAA ACATAATATA ATTTAATACT CCATCTGTTT CATATTAAGT  
1251 GTCATTGTAA CATTATTTTT TTGTTACAAA AAAATTGTCA CTTTAGAATT



## FIGURE 2 (suite)

1301 CCAATGCAAA ATTTATTTAT TTTTCAGCTA AAATTAATTG CAAAGTGCAT  
 1351 TGATCTTATA AATAATTTTA TTTATCTCAA ATGCTATATT GGTCAAACAT  
 1401 GTGTAATTAA TAGAACTTA ATTATATTTT ATTTATTTTT TCTTAATCTG  
 1451 TGTA AAAATG TCAAAGTAA ATTTATTTAG AAACGAATTG AGTAATATTT  
 1501 TGTTTCATTT TTTAAAAGAT ATCGAATATG AAATAACACA ATTTTATTGT  
 1551 ATGATGAACC TAAAAATTCA TCCTAAGAAG GTGAACGCAA GAATAAGTCA  
 1601 ACGTTTTGGG GAAAGCTAAC TATGGCCCAA AGTCATCAAA ATCTTTCTTG  
 1651 TATTTATCAA AATCCTTACA AATTTAGTTA GAGTTAATAG ACCAAACACA  
 1701 TGATTATCAT CATATTAGAA TATTCTAAAA AATTACTAGC GAATAATTAA  
 1751 AATCTTTCTT TTATTTATCA AAATCCTTAT AAAAATTAT TTATATATAC  
 1801 TAAACAATT TTAATTA AAA GAAAATAAGG GACCATGGAT ACATAAAAAT  
 1851 ATATGTTATT TCTTAAGATA GTGATAATAT TAATATATAC CAGTCCATAT  
 1901 ATTTATCAAA ATAAATAATA TTTTTCGTAG TCCGATAATC ATTACTATAA  
 1951 ATTCATAAAA CCACATGTAG ATGTATATTT TATTTATATA TATATATATA  
 2001 AACCCTAACG CCTTACCACT CGATAACCAT CAAAACTTTT CTTCTCGTTT  
 2051 CGCTAACTCA AGGCTTCGAA AAGTAAAAAA AACAATGAAG AATGTCACAC  
 2101 TTGTTCTTGC TATGATCCTC TTCTTAAGCT GTGTCACATC CAAAGTTACA  
 2151 GCAACAGAAC TAGAGTCATC AACTAACCAA GAGCTCTTCC TATCGCGGCA  
 2201 CTTACCTCGC TTTCACCCCA AGCAACATTG GCCGTTCCGT GGCTCCGGAA  
 2251 AAGCCTTCCC TGCAGGCCAC TTCCGACTAA CTCCGTTCCA TCTGCCACAG  
 2301 GAAGTCACCA GATGCTTGAA CGACAAGAAG GAGGTAGGTA CATGTTTTAA  
 2351 TGATATCGCT GAGACTTTCT TCACCAGGAA AGCCGCTATT GGATCGGAAT  
 2401 GTTGCGCCGC GATCAAGAAG ATGAACAAAG ATTGTGAGAA GACCGTCTTT  
       M3 TTT  
 2451 GGATCTTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC  
       M3 GGATCTTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC  
 2501 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTTACATG  
       M3 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTTACATG





2551 CTCCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC CTTACATGC TCCTTCACAG  
M3 CTCCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC CTTACATGC TCCTTCACAG

2601 GCTCCTTTAA ATGCTCCTTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC  
M3 GCTCCTTTAA ATGCTCCTTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC

2651 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCCTTC ACAGGCCCTT TTACATGCTC  
M3 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCCTTC ACAGGCCCTT TTACATGCTC

2701 CTTTACTGCC CCCTTCGCAG GTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT  
M3 CTTTACTGCC CCCTTCGCAG GTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT

2751 TTGATAGAAT TATTCAAGTA TTGATGTCCT AGGGAGTTTT AGTTTTTTTC  
M3 TTGATAGAAT TACTCAAGTA ATGATGCCCT AGGGAGTTTG AGTTTTTCTC

2801 TTGTTTTAAA ATTTTGTGTT TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTTAA  
M3 GTGTTTTAAA GTTTTGTGTT TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTTAA

2851 CTT  
M3 CTT

FIGURE 2 (suite)



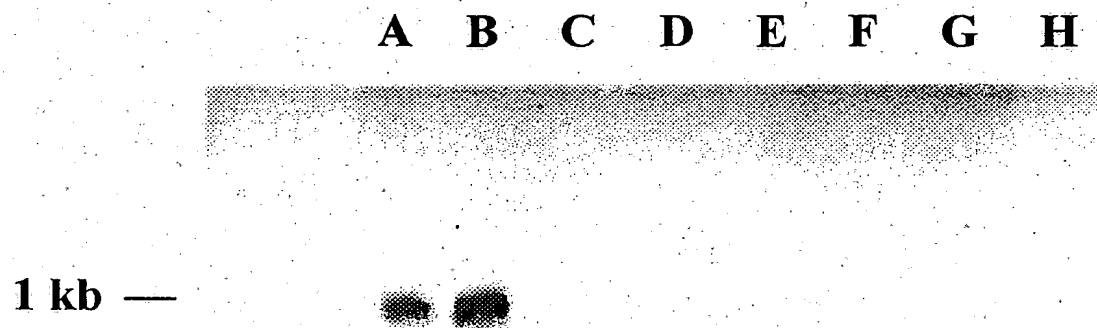


FIGURE 3



6/10

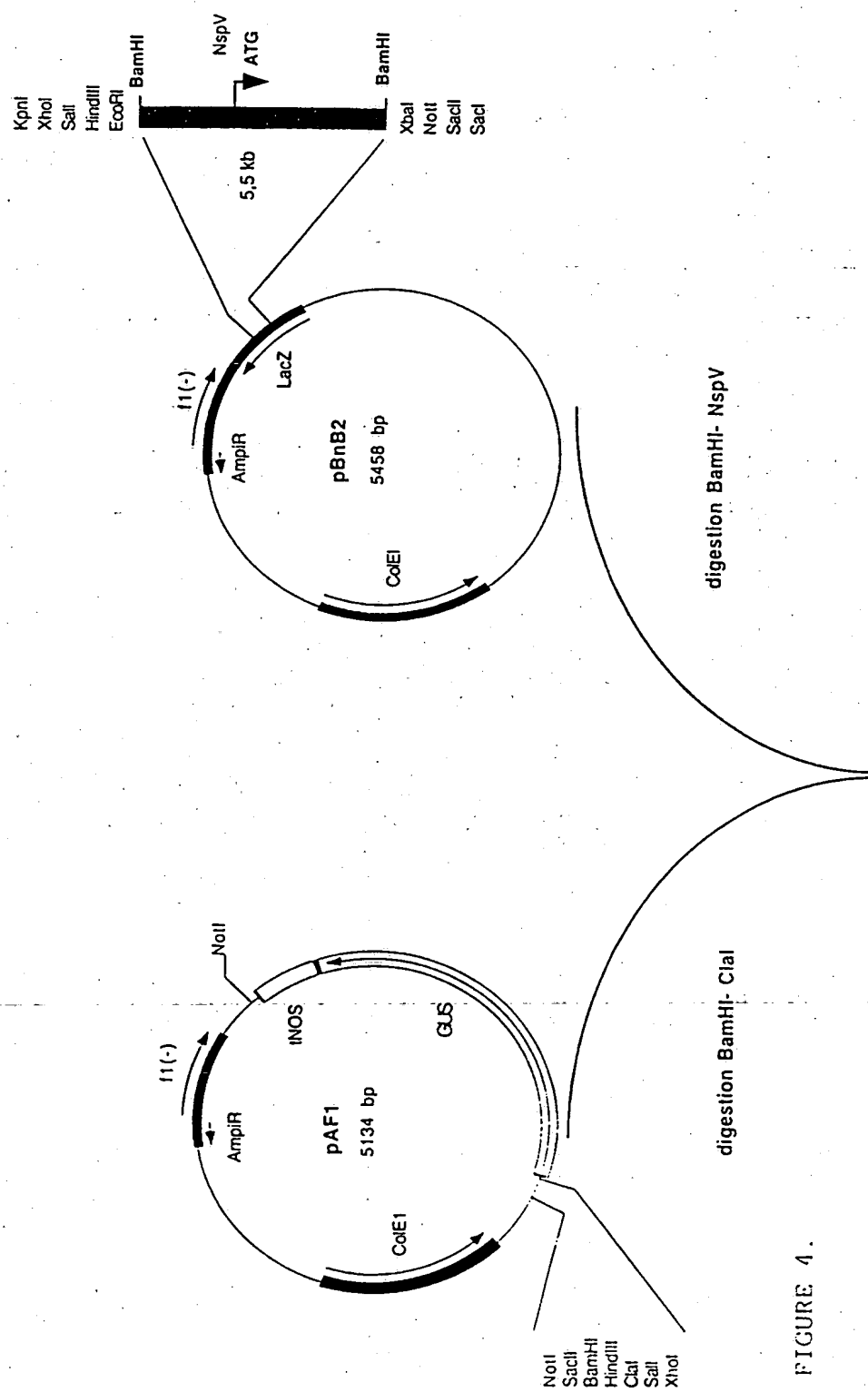


FIGURE 4.



7/10

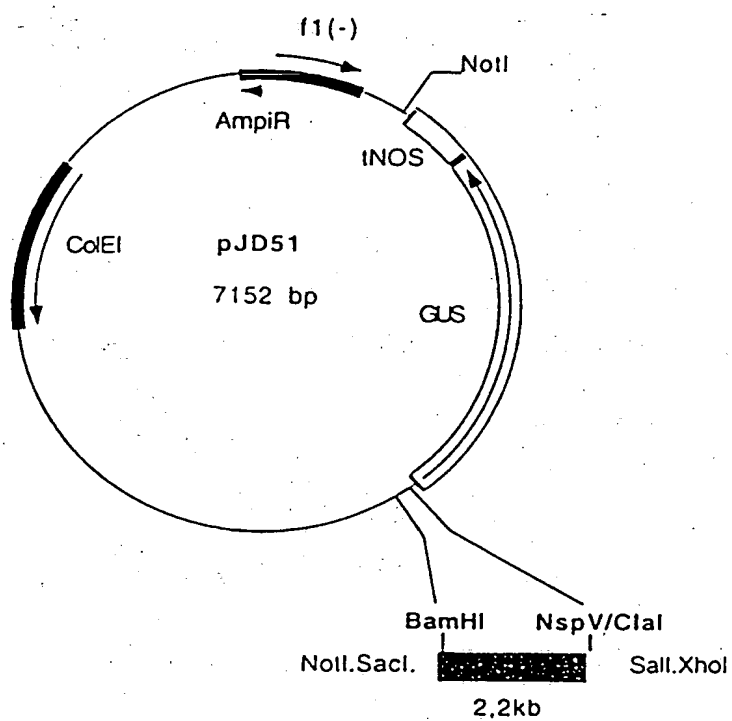


FIGURE 4 (suite)





8/10

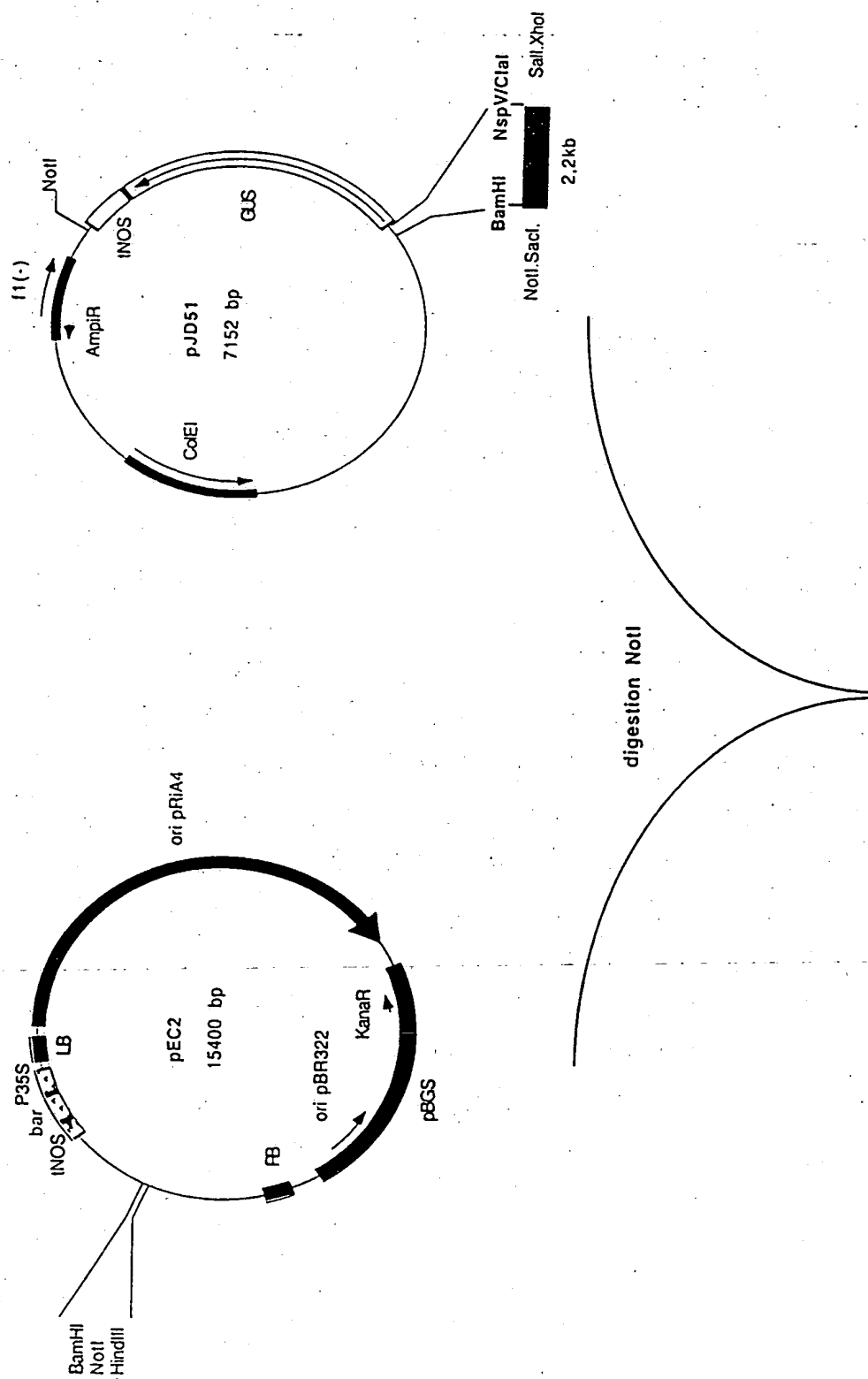
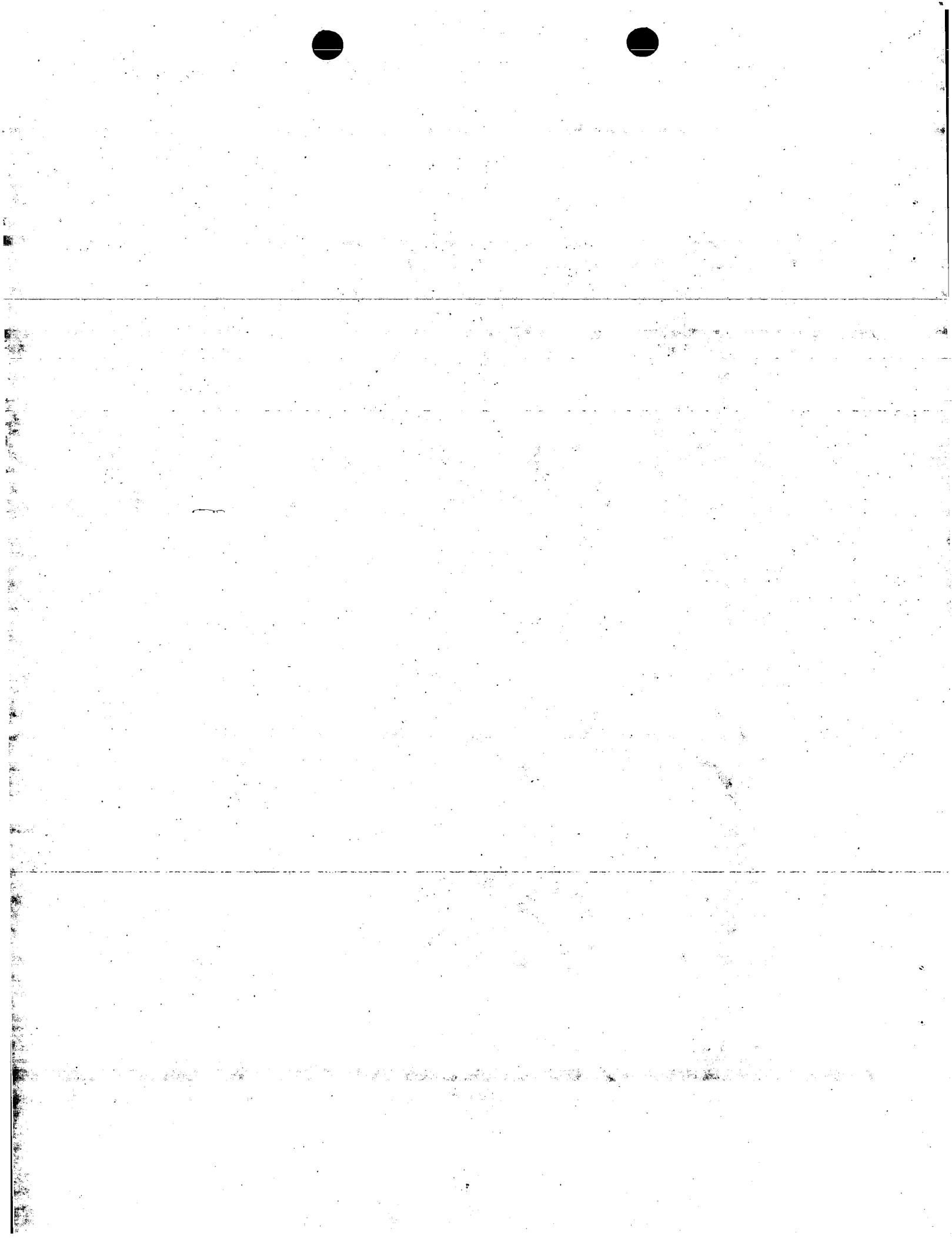


FIGURE 5.



9/10

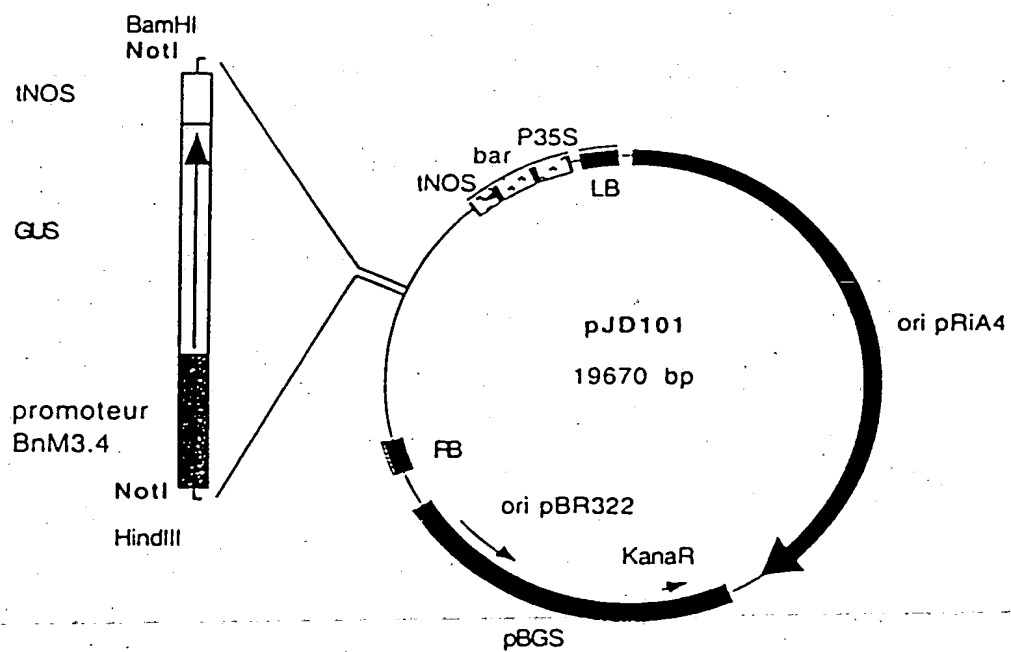


FIGURE 5 (suite)



10/10

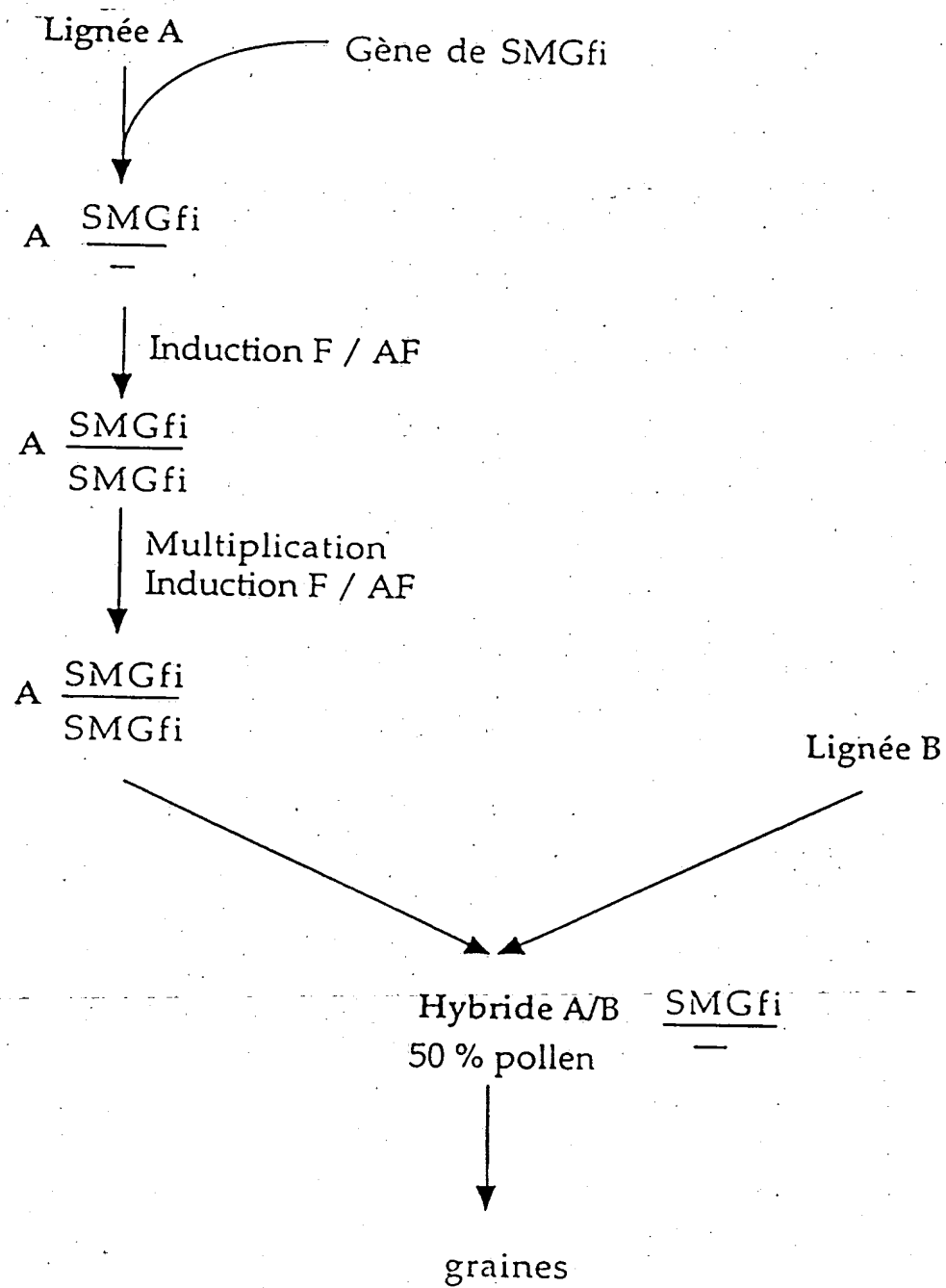
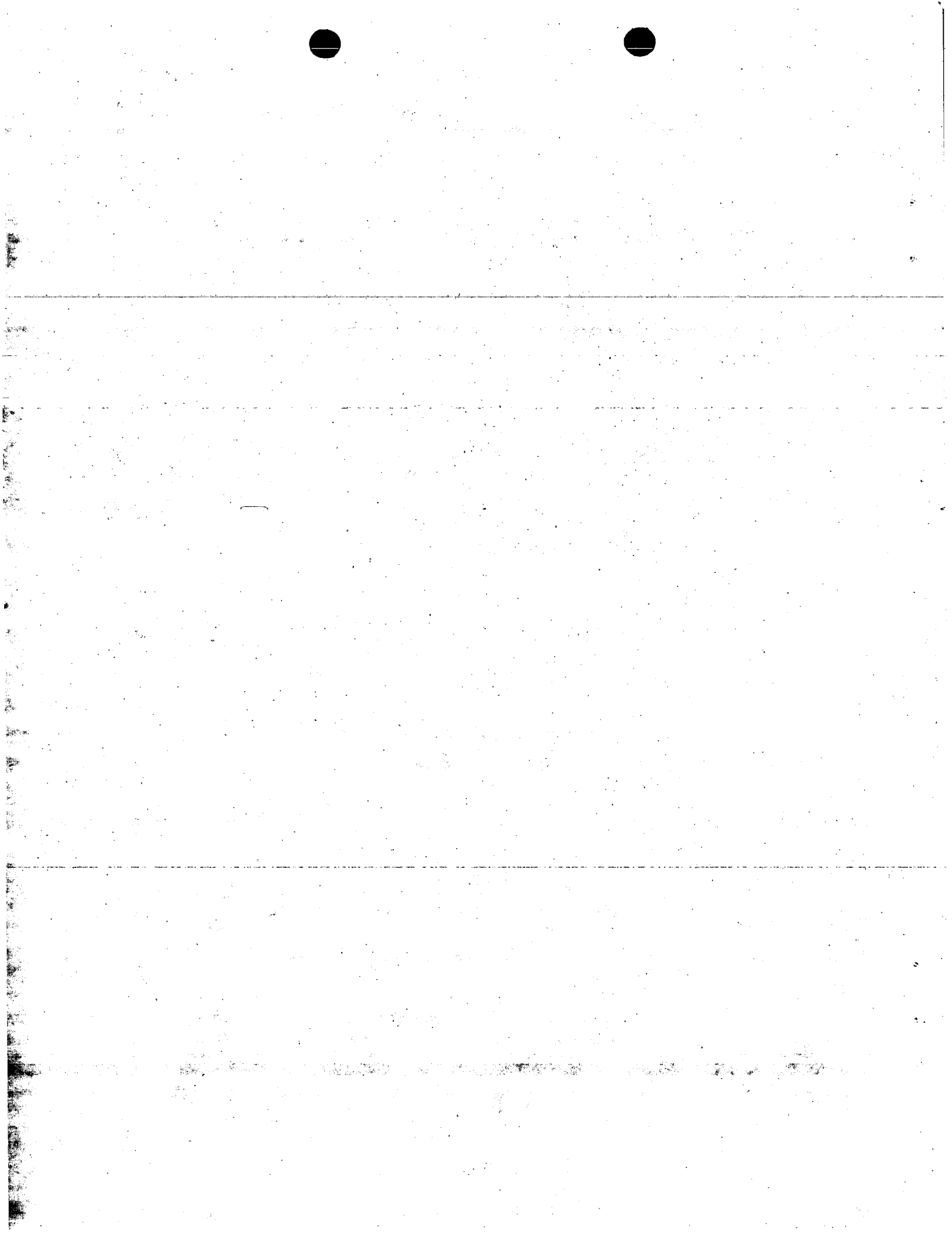


FIGURE 6



## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INRA (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE)
- (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Promoteur spécifique de microspores et procédé d'obtention de plantes hybrides

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 497 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: M3

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTTGGATCTT TCCATGACCC CTTCTTGACC GGCTATGTCA AGCTACATTG CTCCACCGTT	60
GTTGGATCTA CTTACCTCC TCCTTCACAG GCTCCTTTAC ATGCTCCTTC TTCACAGGCT	120
CCTTCACATG CTCCTTCACA TGCTCCTTCA CAGGCTCCTT TAAATGCTCT TTTAAATGCT	180
CCTTTACATG CTCCTTTACA TGCTCCTTCA CAGGCCCTT CACAGGCCCC TTCACAGGCC	240
CCTTTACATG CTCCTTTACT GCCCCCTTCG CAGGCTCCTT CACCGGCTCA GTGATTTAGC	300
TATTTGATAG AATTACTCAA GTAATGATGC CCTAGGGAGT TTGAGTTTTT CTCGTGTTTT	360





AAAGTTTTGT GTTTATTTTG AGAAAACCGT CTTTGGATTT TAACTTCACT TTGATTTTTT 420  
 CCCTTATACA ATTTAAATTT AGAGTTTACT TATTAATTTT ATAAATTAGA TGGTACTAAG 480  
 TTTTATCAT AATAAAA 497

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 674 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

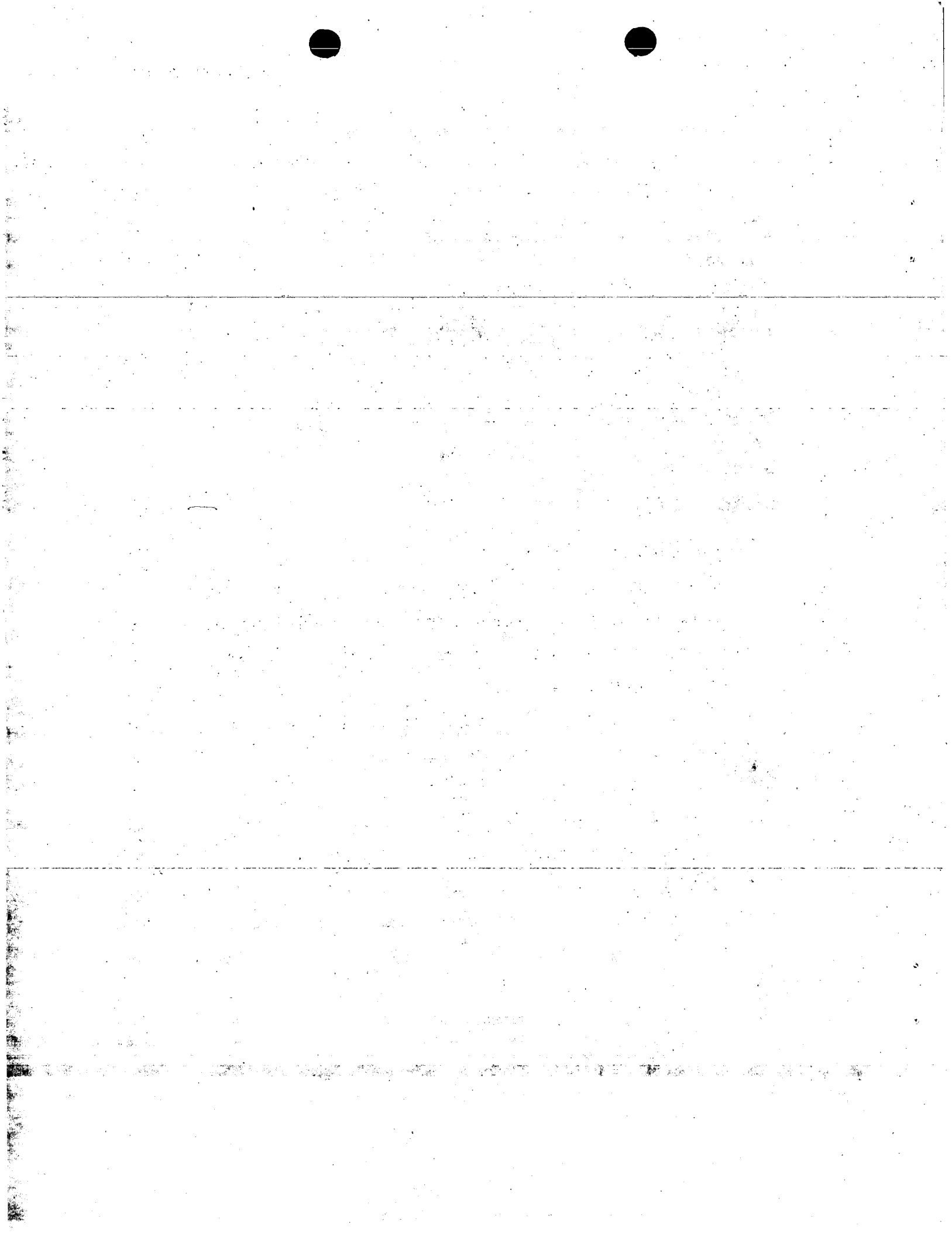
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: M3.21

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TCTTGCTATG ATTTTCTTCA TAAGATGTGT CACATCCAAA GTCACAGCAA CAGAACTAGA 60  
 GTCATCAACT AACCAAGAGC TCTTCCTATC GCGGCACTTG CCTCGCTTTC ACCCCAAGCC 120  
 ACATTGGCCG TTCTGTGGCT CCGGAAAAGC CTTCCCTGCA GGCCACTTCC GACCAACTCC 180  
 GTTCCATCTG CCACAGGAAG TCACCAGATG CTTGTCCGAC AAGAAGGAGG TAGGTACATG 240  
 TTTTGATGAT ATCGTTGAGA CTTTCTTCAC CAGGAAAGCC GTTATTGGAT CGGAATGTTG 300  
 CGCCGCGATC AAGAAGATGA ACAAAGATTG TGAGAAGACC GTCTTTGGAT CTTTCCATGA 360  
 CCCCTTCTTG ACAGGCTATG TCAAACCTACA TTGCTCCACC GTTGTTGGAT CTACTTCACC 420  
 TCCTCCTTCA CATGCTCCTT CACAGGCTCC TTTACATGCT CCTTCACAGG CTCCTTTACA 480  
 TGCCCCTTCA CAGGCTCCTT TACTGCCCCC TTCACAGCCT CTCCCACCGG CTCAGTGATT 540  
 TTAGCTATTT GTTAGAATTA TTCAAGTGTT GATGTCCTAG GGAGTTTTAG GTTTTCTTG 600  
 TTTTAAAATT TTGTGTTTAT TTTGAGAAAA CCGTCTTTGG ATCTTAACTT CACTTTGATT 660  
 TTTTCCTTAT ACAA 674

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 2853 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple



(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

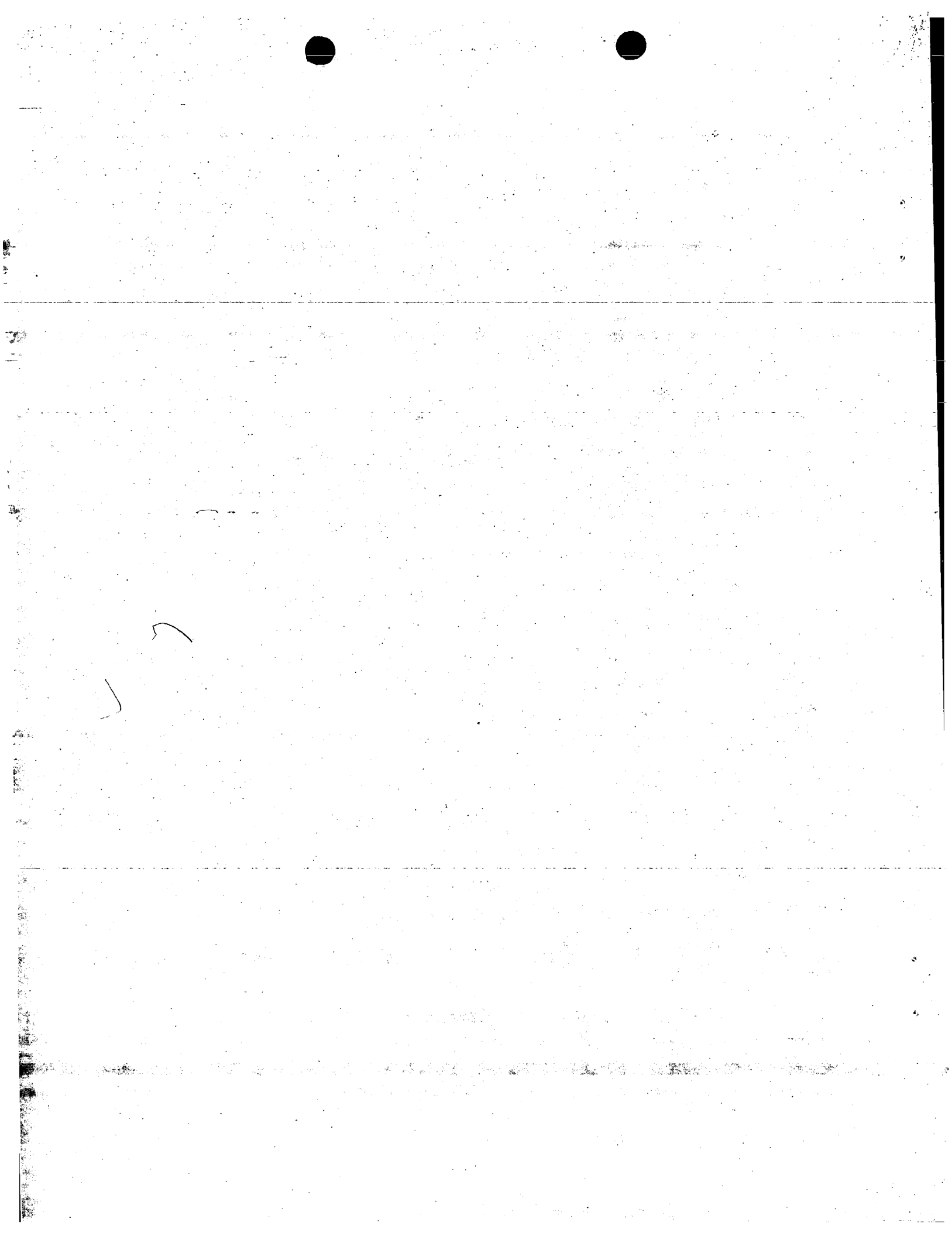
(A) NOM/CLE: BnM3.4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTTCCTAC CTTCATAAAT ATATATTTGT	60
TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAATCCTT TAGCTCAATG GTATAAATGT TGTTGTTTAG	120
ATTTCAATAA CCCGGGTTTCG AGTCATAGAC TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAGAGTGG	180
AACGCACATA TCGCTGACGT GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG	240
ATTTAAAAGT GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT	300
ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCTTT TTAAATCTTA ATAATAATAC CAGNGCTTTT	360
ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT CTTTTTTTTT GANCCGTTGA	420
TTGGTTTATG CTTATTTGAA TGTNGCCNAC GTAAGAAATG AAGAACAATT TATATTTGGA	480
GAAAATATAA TTTAATATGT TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA	540
TGGATGCGAG TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCTTTTCT CAAAAAGTAA	600
AATATTTGAT ATGTAACCTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAATTA AATCAAATA	660
GAAAAAATG ATAGTGATCT ACCCTTCAAC GTTTTGAAC TATTCTTGGT TCACCCCTA	720
AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAATTT CATTATTGCA TATTCTATAT CTTTGTAGAA	780
GTGAAACAAA ATATTATCAA GTTATATTAT GTTTTTCAAA TAAAAAGATA AAAAATAAAT	840
AAAAAATAAT AGTAGTTACA AAAAAAAAAA ATTAATATTT TTACCAGCGT CANAAAACAC	900
TAAAACCTAA ACCCTAAATA TTAAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTTG GATAAATCTT	960
AAACATTAAA CATTAAAACA CTAAACCCTA AATCCTAAAC TCTAAACCCT TAAGTGTTTA	1020
AATGTTTAGT GTTTTTGATT TATAGTTTAG GATTTATCCA AAGGTTTAAG GTTTACCCAA	1080
GAGTTTATGG TTTAGGGATT ATGACTTAGG ATTTAGTGTT TTAGTGACGA CGTTCAAAGT	1140
ATTTTTTAA AAATATTTTT TTTGTAAACA CTACTATTTT TATTTATTTT TTTACCTTTT	1200
TATATTAAA ACATAATATA ATTTAATACT CCATCTGTTT CATATTAAGT GTCATTGTAA	1260



CATTATTTTT TTGTTACAAA AAAATTGTCA CTTTAGAATT CCAATGCAAA ATTTATTTAT	1320
TTTTCAGCTA AAATTAATTG CAAAGTGCAT TGATCTTATA AATAATTTTA TTTATCTCAA	1380
ATGCTATATT GGTCAAACAT GTGTAATTAA TAGAACTTA ATTATATTTT ATTTATTTTT	1440
TCTTAATCTG TGTA AAAATG TCAAAGTAAA ATTTATTTAG AACGAATTG AGTAATATTT	1500
TGTTTCATTT TTAAAAGAT ATCGAATATG AAATAACACA ATTTTATTGT ATGATGAACC	1560
TAAAAATTCA TCCTAAGAAG GTGAACGCAA GAATAAGTCA ACGTTTGGG GAAAGCTAAC	1620
TATGGCCCAA AGTCATCAAA ATCTTCTTG TATTTATCAA AATCCTTACA AATTTAGTTA	1680
GAGTTAATAG ACCAAACACA TGATTATCAT CATATTAGAA TATTCTAAAA AATTACTAGC	1740
GAATAATTAA AATCTTCTT TTATTTATCA AAATCCTTAT AAAAATTAT TTATATATAC	1800
TAAACAATT TTAATTAAAA GAAAATAAGG GACCATGGAT ACATAAAAA ATATGTTATT	1860
TCTTAAGATA GTGATAATAT TAATATATAC CAGTCCATAT ATTTATCAAA ATAAATAATA	1920
TTTTTCGTAG TCCGATAATC ATTACTATAA ATTCATAAAA CCACATGTAG ATGTATATTT	1980
TATTTATATA TATATATATA AACCCTAACG CCTTACCACT CGATAACCAT CAAAATTTT	2040
CTTCTCGTTT CGCTAACTCA AGGCTTCGAA AAGTAAAAA AACAATGAAG AATGTCACAC	2100
TTGTTCTTGC TATGATCCTC TTCTTAAGCT GTGTCACATC CAAAGTTACA GCAACAGAAC	2160
TAGAGTCATC AACTAACCAA GAGCTCTTCC TATCGCGGCA CTTACCTCGC TTTCACCCCA	2220
AGCAACATTG GCCGTTCCGT GGCTCCGGAA AAGCCTTCCC TGCAGGCCAC TTCCGACTAA	2280
CTCCGTTCCA TCTGCCACAG GAAGTCACCA GATGCTTGAA CGACAAGAAG GAGGTAGGTA	2340
CATGTTTTAA TGATATCGCT GAGACTTTCT TCACCAGGAA AGCCGCTATT GGATCGGAAT	2400
GTTGCGCCGC GATCAAGAAG ATGAACAAAG ATTGTGAGAA GACCGTCTTT GGATCTTTCC	2460
ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC CACCGTTGTT GGATCTACTT	2520
CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTTACATG CTCCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC	2580
CTTCACATGC TCCTTCACAG GCTCCTTTAA ATGCTCCTTT AAATGCTCCT TTACATGCTC	2640
CTTTACATGC TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCTTC ACAGGCCCTT TTACATGCTC	2700
CTTTACTGCC CCCTTCGCAG GCTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT TTGATAGAAT	2760
TATTCAAGTA TTGATGTCCT AGGGAGTTTT AGTTTTTTTC TTGTTTTAAA ATTTTGTGTT	2820
TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTTAA CTT	2853



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02042

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H1/02 A01H5/00 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-locus glycoprotein, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88192, 10 July 1997, XP002068717 see sequence nt 780-1560 ----	1,2
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-receptor kinase, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88193, 10 July 1997, XP002068718 see sequence nt 300-1555 ----	1,2
X	NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MKP11" EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. AB005238, XP002093097 see sequence 74710-75080 ----	1,2
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 1999

Date of mailing of the international search report

24/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02042

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 16182 A (PIONEER HI BRED INT) 30 May 1996 see the whole document ---	7,8,11, 12
X	WO 90 08828 A (PALADIN HYBRIDS INC) 9 August 1990 see the whole document ---	7,8,11, 12
X	EP 0 790 311 A (CT VOOR PLANTENVEREDELINGS EN ;UNIV NIJMEGEN (NL)) 20 August 1997 see the whole document ---	7,8
X	EP 0 329 308 A (PALADIN HYBRIDS INC) 23 August 1989 see the whole document ---	7,8
X	KANDASAMY, M.K., ET AL.: "Ablation of papillar cell function in Brassica flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination" THE PLANT CELL, vol. 5, 1993, pages 263-275, XP002067958 see page 264, right-hand column - page 266 ---	7,8
X	EP 0 436 467 A (CIBA GEIGY AG) 10 July 1991 see page 24, line 45 - page 25, line 1 see page 37, line 35 - line 52 see page 26, line 26 - line 30 ---	7,8
X	WO 94 13809 A (UNIV MELBOURNE ;KNOX ROBERT BRUCE (AU); SINGH MOHAN BIR (AU); XU H) 23 June 1994 see example 13 ---	7,8
A	WO 94 25613 A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 10 November 1994 see page 26, line 30 - page 27, line 27; claims 42-44 ---	1
A	WO 92 18625 A (MOGEN INT) 29 October 1992 see page 25, line 30 - page 26, line 30 ---	9
A	WO 90 08830 A (ICI PLC) 9 August 1990 see page 10, line 24 - page 11, line 13; claim 28; figures 1,2 ---	9
A	WO 94 21804 A (PIONEER HI BRED INT ;NEILL JOHN D (US); PIERCE DOROTHY A (US); CIG) 29 September 1994 see page 16 - page 23 see page 31 - page 32 ---	1-8
	--- -/--	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 98/02042

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENIS, M., ET AL.: "Expression of engineered nuclear male sterility in Brassica napus" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 101, 1993, pages 1295-1304, XP002009916 see the whole document -----	12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616182 A	30-05-1996	US 5633438 A AU 701202 B AU 4194496 A CA 2205505 A EP 0797674 A NZ 297145 A US 5756324 A	27-05-1997 21-01-1999 17-06-1996 30-05-1996 01-10-1997 25-11-1998 26-05-1998
WO 9008828 A	09-08-1990	AU 1628695 A AU 655574 B AU 5037290 A EP 0456706 A JP 9182589 A JP 4504355 T US 5728558 A US 5728926 A US 5741684 A US 5356799 A	03-08-1995 05-01-1995 24-08-1990 21-11-1991 15-07-1997 06-08-1992 17-03-1998 17-03-1998 21-04-1998 18-10-1994
EP 0790311 A	20-08-1997	AU 1676897 A WO 9730166 A	02-09-1997 21-08-1997
EP 0329308 A	23-08-1989	AU 2963289 A US 5728558 A US 5728926 A US 5741684 A US 5356799 A	03-08-1989 17-03-1998 17-03-1998 21-04-1998 18-10-1994
EP 0436467 A	10-07-1991	AU 642454 B AU 6855490 A CA 2033247 A EP 0825262 A	21-10-1993 11-07-1991 30-06-1991 25-02-1998
WO 9413809 A	23-06-1994	AU 5688994 A EP 0674711 A	04-07-1994 04-10-1995
WO 9425613 A	10-11-1994	AU 6819194 A US 5859328 A	21-11-1994 12-01-1999
WO 9218625 A	29-10-1992	AU 663871 B AU 1698992 A BR 9205894 A CA 2105592 A CZ 9302145 A EP 0513884 A HU 65482 A JP 6506595 T SK 111693 A	26-10-1995 17-11-1992 27-09-1994 17-10-1992 13-07-1994 19-11-1992 28-06-1994 28-07-1994 02-02-1994
WO 9008830 A	09-08-1990	AU 621195 B AU 4945690 A CA 2008700 A EP 0455665 A HU 215090 B JP 4504500 T US 5808034 A	05-03-1992 24-08-1990 26-07-1990 13-11-1991 28-09-1998 13-08-1992 15-09-1998
WO 9421804 A	29-09-1994	US 5583210 A	10-12-1996

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9421804 A		AU 5636898 A	07-05-1998
		AU 683876 B	27-11-1997
		AU 6355194 A	11-10-1994
		BR 9405950 A	19-12-1995
		CA 2158584 A	29-09-1994
		DE 4491714 T	27-06-1996
		HU 73336 A	29-07-1996
		JP 8507691 T	20-08-1996
		NL 9420020 T	01-05-1996
		NZ 263025 A	22-08-1997
		PL 310702 A	27-12-1995
		US 5760190 A	02-06-1998
		US 5728817 A	17-03-1998

---



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

e Internationale No

PCT/FR 98/02042

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H1/02 A01H5/00 A01H5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-locus glycoprotein, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88192, 10 juillet 1997, XP002068717 voir séquence nt 780-1560	1,2
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-receptor kinase, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88193, 10 juillet 1997, XP002068718 voir séquence nt 300-1555	1,2
X	NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MKP11" EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. AB005238, XP002093097 voir séquence 74710-75080	1,2
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 16182 A (PIONEER HI BRED INT) 30 mai 1996 voir le document en entier ---	7,8,11, 12
X	WO 90 08828 A (PALADIN HYBRIDS INC) 9 août 1990 voir le document en entier ---	7,8,11, 12
X	EP 0 790 311 A (CT VOOR PLANTENVEREDELINGS EN ;UNIV NIJMEGEN (NL)) 20 août 1997 voir le document en entier ---	7,8
X	EP 0 329 308 A (PALADIN HYBRIDS INC) 23 août 1989 voir le document en entier ---	7,8
X	KANDASAMY, M.K., ET AL.: "Ablation of papillar cell function in Brassica flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination" THE PLANT CELL, vol. 5, 1993, pages 263-275, XP002067958 voir page 264, colonne de droite - page 266 ---	7,8
X	EP 0 436 467 A (CIBA GEIGY AG) 10 juillet 1991 voir page 24, ligne 45 - page 25, ligne 1 voir page 37, ligne 35 - ligne 52 voir page 26, ligne 26 - ligne 30 ---	7,8
X	WO 94 13809 A (UNIV MELBOURNE ;KNOX ROBERT BRUCE (AU); SINGH MOHAN BIR (AU); XU H) 23 juin 1994 voir exemple 13 ---	7,8
A	WO 94 25613 A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 10 novembre 1994 voir page 26, ligne 30 - page 27, ligne 27; revendications 42-44 ---	1
A	WO 92 18625 A (MOGEN INT) 29 octobre 1992 voir page 25, ligne 30 - page 26, ligne 30 ---	9
A	WO 90 08830 A (ICI PLC) 9 août 1990 voir page 10, ligne 24 - page 11, ligne 13; revendication 28; figures 1,2 ---	9
A	WO 94 21804 A (PIONEER HI BRED INT ;NEILL JOHN D (US); PIERCE DOROTHY A (US); CIG) 29 septembre 1994 voir page 16 - page 23 voir page 31 - page 32 ---	1-8
	---	

-/--

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DENIS, M., ET AL.: "Expression of engineered nuclear male sterility in Brassica napus" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 101, 1993, pages 1295-1304, XP002009916 voir le document en entier -----	12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der Internationale No

PCT/FR 98/02042

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9616182 A	30-05-1996	US 5633438 A	27-05-1997
		AU 701202 B	21-01-1999
		AU 4194496 A	17-06-1996
		CA 2205505 A	30-05-1996
		EP 0797674 A	01-10-1997
		NZ 297145 A	25-11-1998
		US 5756324 A	26-05-1998
WO 9008828 A	09-08-1990	AU 1628695 A	03-08-1995
		AU 655574 B	05-01-1995
		AU 5037290 A	24-08-1990
		EP 0456706 A	21-11-1991
		JP 9182589 A	15-07-1997
		JP 4504355 T	06-08-1992
		US 5728558 A	17-03-1998
		US 5728926 A	17-03-1998
		US 5741684 A	21-04-1998
		US 5356799 A	18-10-1994
EP 0790311 A	20-08-1997	AU 1676897 A	02-09-1997
		WO 9730166 A	21-08-1997
EP 0329308 A	23-08-1989	AU 2963289 A	03-08-1989
		US 5728558 A	17-03-1998
		US 5728926 A	17-03-1998
		US 5741684 A	21-04-1998
		US 5356799 A	18-10-1994
EP 0436467 A	10-07-1991	AU 642454 B	21-10-1993
		AU 6855490 A	11-07-1991
		CA 2033247 A	30-06-1991
		EP 0825262 A	25-02-1998
WO 9413809 A	23-06-1994	AU 5688994 A	04-07-1994
		EP 0674711 A	04-10-1995
WO 9425613 A	10-11-1994	AU 6819194 A	21-11-1994
		US 5859328 A	12-01-1999
WO 9218625 A	29-10-1992	AU 663871 B	26-10-1995
		AU 1698992 A	17-11-1992
		BR 9205894 A	27-09-1994
		CA 2105592 A	17-10-1992
		CZ 9302145 A	13-07-1994
		EP 0513884 A	19-11-1992
		HU 65482 A	28-06-1994
		JP 6506595 T	28-07-1994
		SK 111693 A	02-02-1994
WO 9008830 A	09-08-1990	AU 621195 B	05-03-1992
		AU 4945690 A	24-08-1990
		CA 2008700 A	26-07-1990
		EP 0455665 A	13-11-1991
		HU 215090 B	28-09-1998
		JP 4504500 T	13-08-1992
		US 5808034 A	15-09-1998
WO 9421804 A	29-09-1994	US 5583210 A	10-12-1996



**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

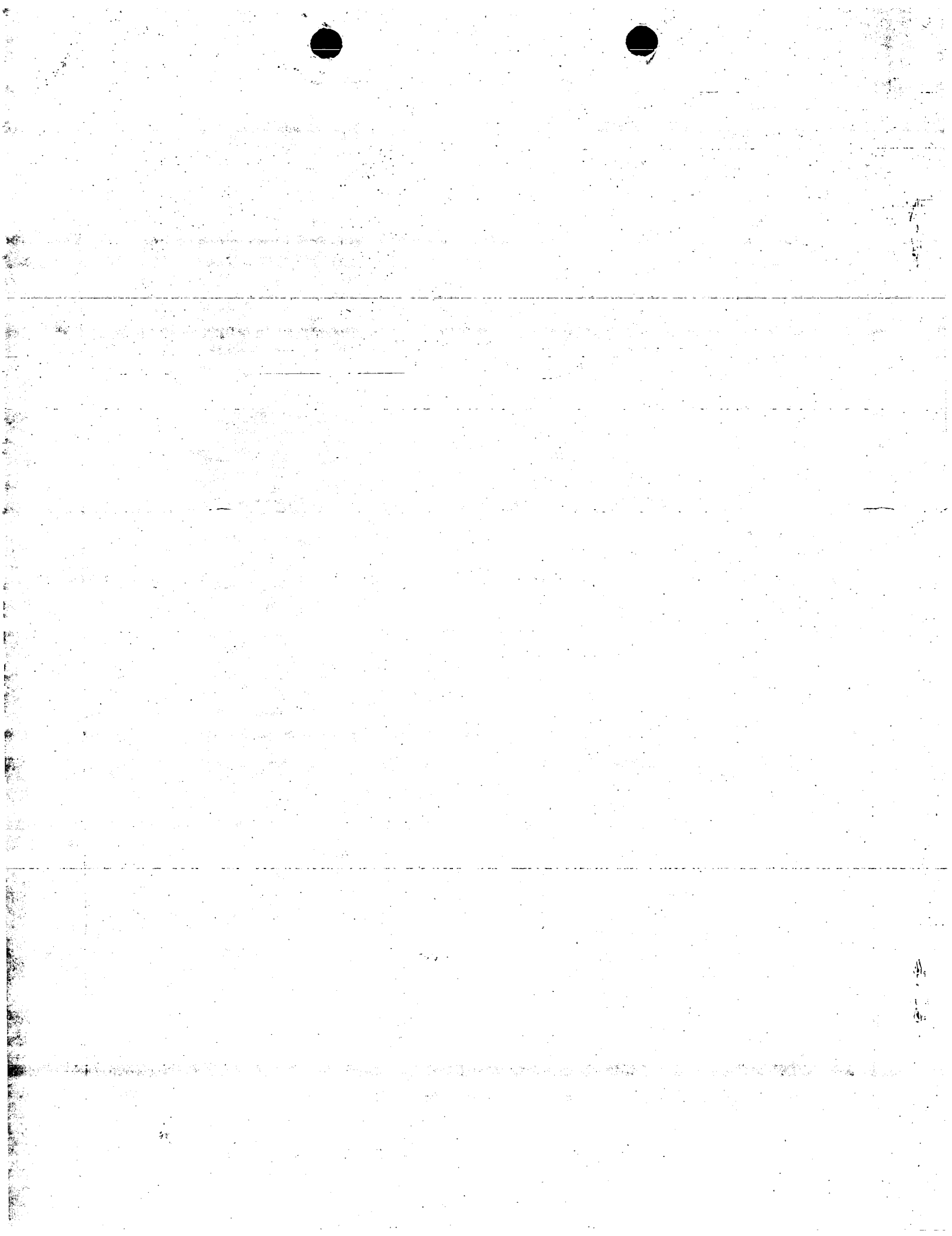
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

le Internationale No

PCT/FR 98/02042

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9421804 A		AU 5636898 A	07-05-1998
		AU 683876 B	27-11-1997
		AU 6355194 A	11-10-1994
		BR 9405950 A	19-12-1995
		CA 2158584 A	29-09-1994
		DE 4491714 T	27-06-1996
		HU 73336 A	29-07-1996
		JP 8507691 T	20-08-1996
		NL 9420020 T	01-05-1996
		NZ 263025 A	22-08-1997
		PL 310702 A	27-12-1995
		US 5760190 A	02-06-1998
		US 5728817 A	17-03-1998

---



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 339386/17043	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02042	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 23 September 1998 (23.09.98)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 23 September 1997 (23.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input checked="" type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 April 1999 (21.04.99)	Date of completion of this report 07 December 1999 (07.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02042

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

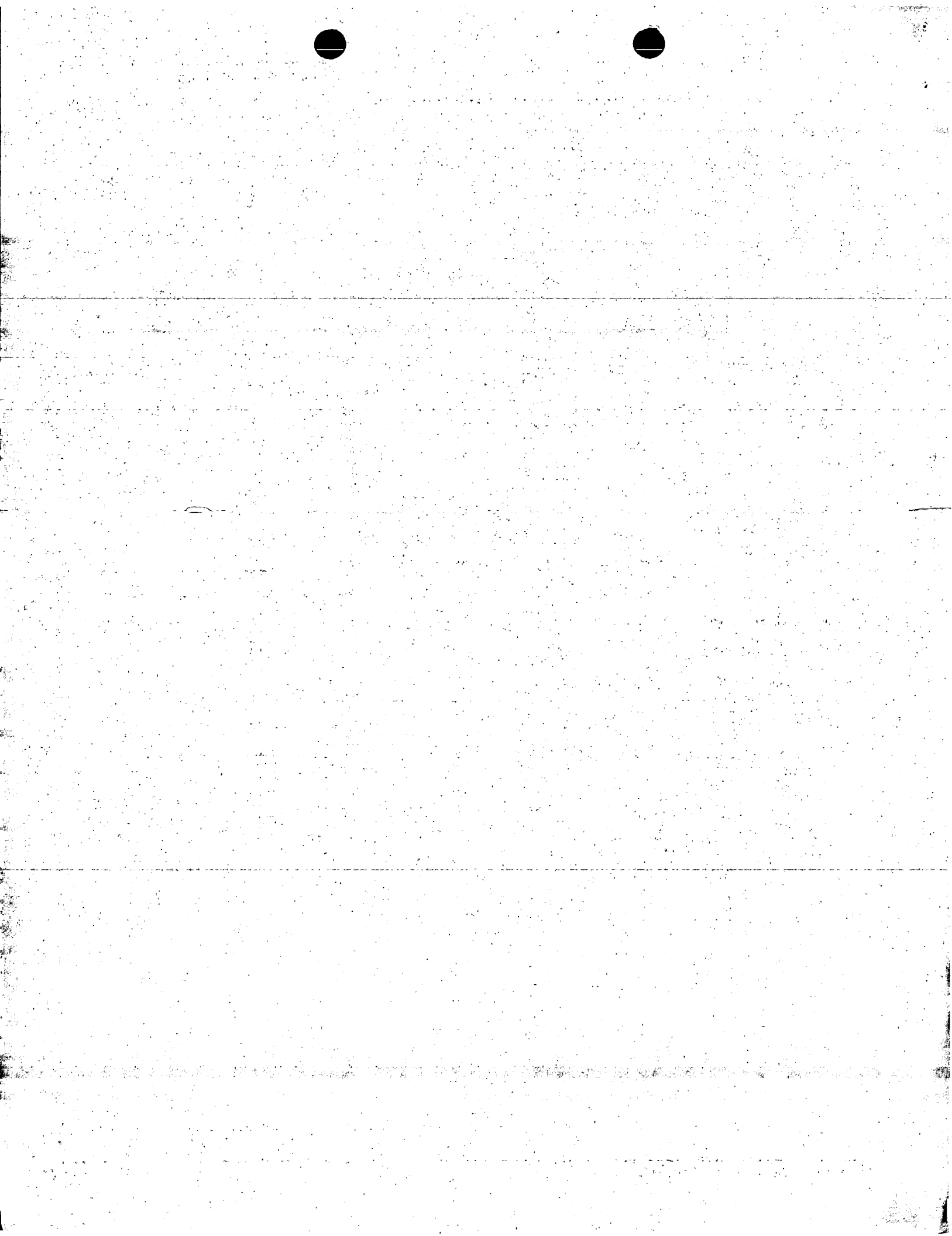
- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-13, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/10-10/10, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02042

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 7.8 and 11.12 partially.

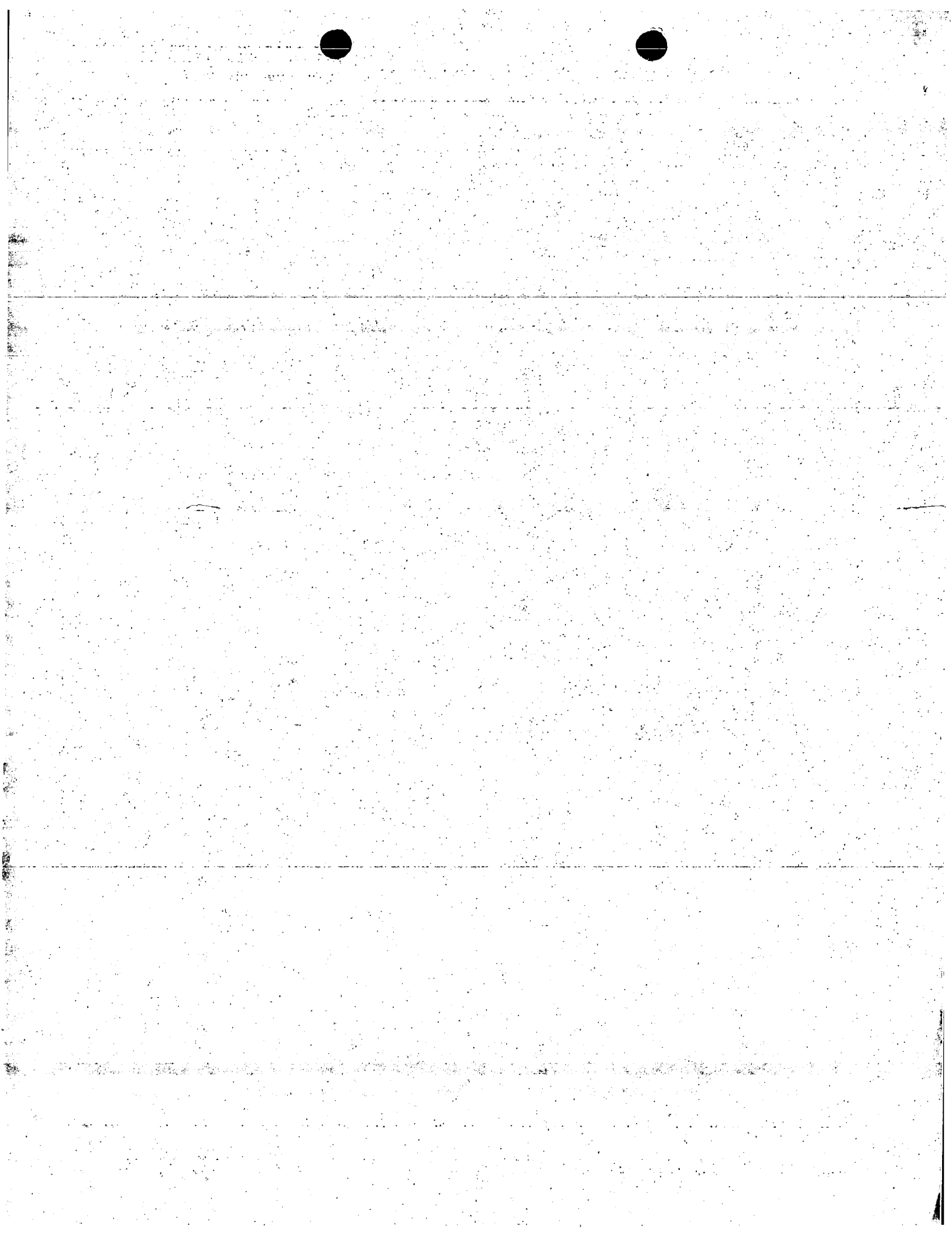
because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 7.8 and 11.12 partially  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

**See the separate sheet.**

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



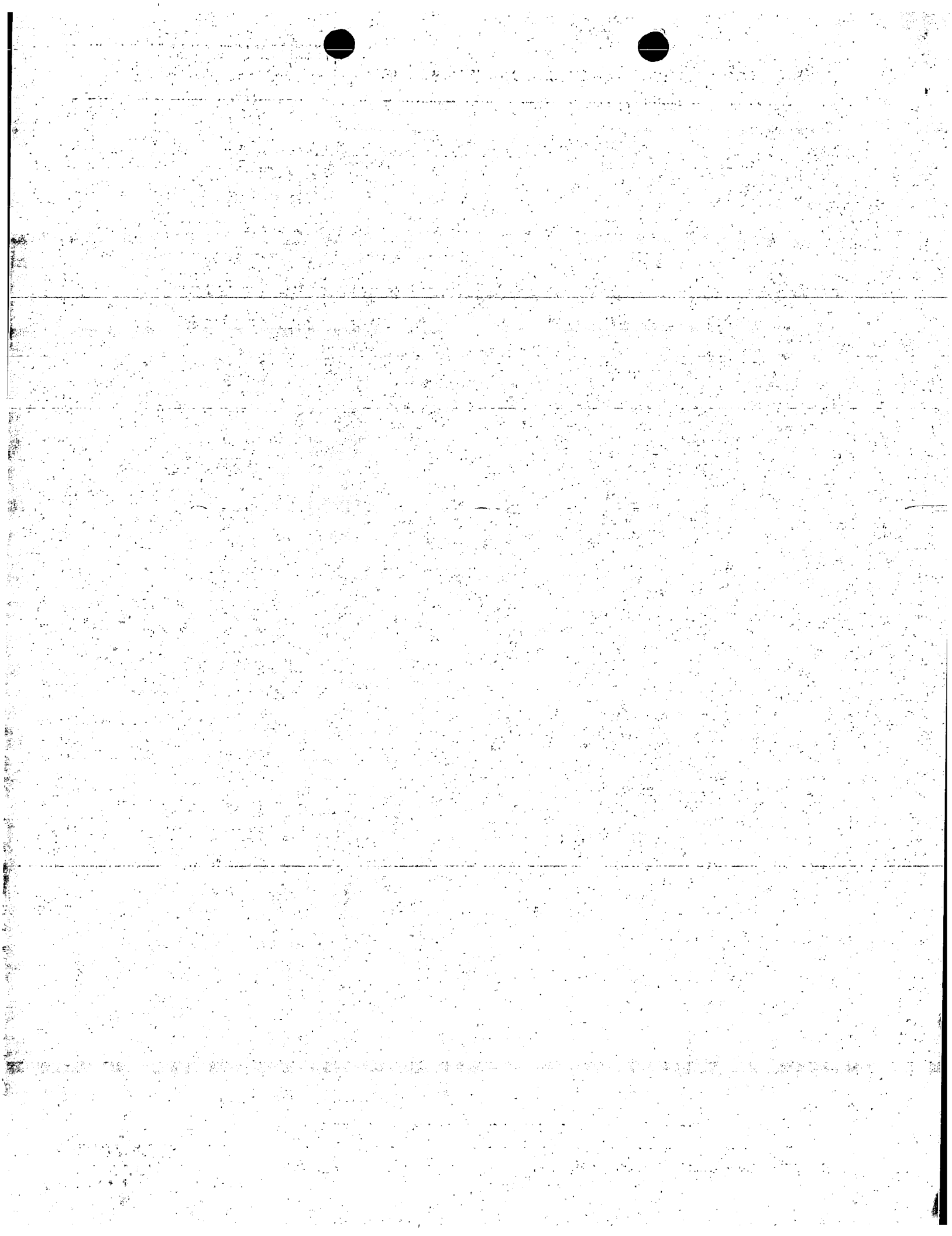


**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

An opinion cannot be given regarding the novelty, inventive step and industrial applicability of Claims 7 and 8 (and the claims referring thereto, i.e. in part 11 and 12), since said claims do not contain any technical features. Claims 7 and 8 attempt to define this subject matter by the result to be achieved, which amounts to a simple statement of the fundamental problem to be solved by the invention. The technical features necessary to arrive at this result and to solve the problem must be added.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 98/02042

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 9-12	YES
	Claims	1-3, 5, 6	NO
Inventive step (IS)	Claims	9-12	YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6, 9-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: EMBL Database AC. N°: D 88192
- D2: EMBL Database AC. N°: D 88193
- D3: EMBL Database AC. N°: AB 005238
- D4: WO 9616182
- D5: WO 9008828

### Novelty

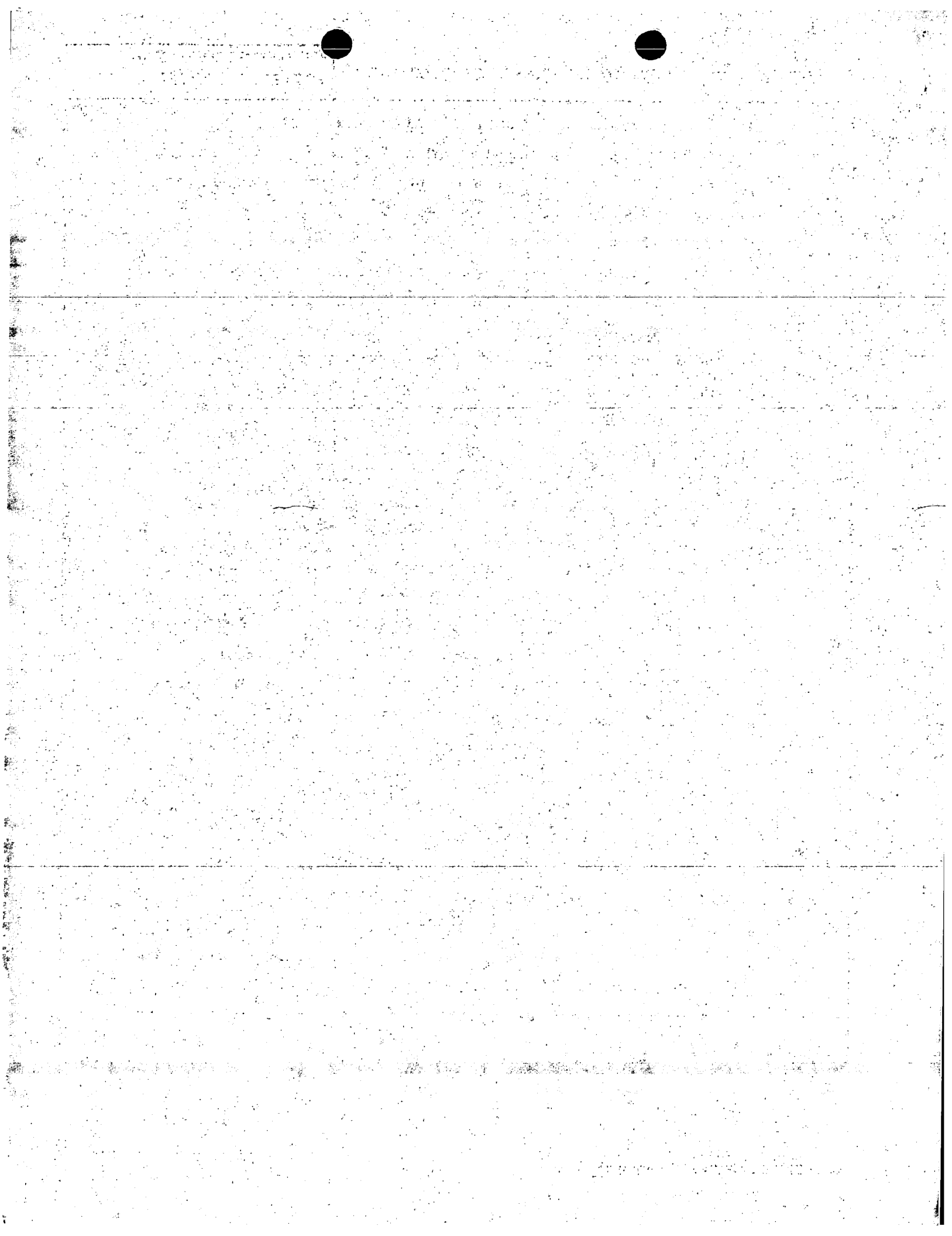
1. Claims 4 and 9 to 12 are novel, since they are not described in the prior art documents cited by the search report.
2. Documents D1, D2 and D3 describe the nucleotide sequences having respectively 54%, 57% and 70% homology with all or part of the sequence SEQ ID N° 3, in particular that extending from nucleotide 1 to nucleotide 2111.  
Furthermore, i) any kind of nucleotide anticipates the novelty of Claims 1 and 2, since a sequence "portion" can consist of a single nucleotide.  
ii) a nucleotide sequence having 80% homology with a sequence hybridizing to the sequence SEQ ID N° 3



and/or a part extending from nucleotide 1 to nucleotide 2111 (Claims 1c and 2c) covers a large number of nucleotide sequences, of which some are not obviously novel (see Box VIII).

Consequently, in view of D1, D2, D3, and i) and ii) above, Claims 1 and 2 do not satisfy the requirements of PCT Article 33(2).

3. D4 describes a method of obtaining plants with male sterility, by transforming a plant or plant cell with a vector comprising a gene coding for a cytotoxic substance and placed under the control of a specific promoter of *Brassica napus* pollen (Claims 11, 21, 43 and 46). The fertility of the plants thus obtained can be induced by crossing them with another line of transgenic plants, comprising a construction cancelling out the effects of the cytotoxic substance of the plant having male sterility.
4. D5 describes a method of obtaining plants (for example, *Brassica napus*) with an inducible male sterility and plants with the same features. This method consists in transforming a plant with a vector comprising a gene coding for a cytotoxic substance placed under the control of a specific promoter of microspores. This cytotoxic substance can be a toxin (page 21, lines 3 to 12, Claim 10) or an "anti-sense" RNA, able to inhibit the expression of a protein, which interrupts a biosynthesis or metabolite path necessary for the development of microspores (page 20, line 27 to page 21, line 2). The inhibition can be removed by treating this plant with a substance normally produced by means of biosynthesis downstream of the interruption site



(page 28, line 29 to page 29, line 3, Claim 21) or by crossing the plant with one which is transgenic and comprises a gene cancelling out the effect of the gene responsible for male sterility (page 28, lines 6 to 16).

Given that the subject matter of Claims 1 to 3, 5 and 6 is not limited to the specific sequence SEQ ID N° 3 and to the technical features such as male gametophytic sterility, Claims 1 to 3, 5 and 6 do not satisfy the requirements of PCT Article 33(2) in view of D4 or D5.

#### Inventive step

5. Claims 9 to 12 involve an inventive step, since the prior art does not show that the nucleotide sequence SEQ ID N° 3 in conjunction with the gene coding for subtilisin enables male gametophytic sterility with inducible fertility to be obtained.
6. The subject matter of Claims 3 and 4 consists only in selecting a gene coding for a particular cytotoxic substance and the use of the same substance in a non-novel method. This particular selection can be considered inventive only if it has surprising effects or properties in relation to those anticipated by a person skilled in the art. Nevertheless, that does not appear to be the case. Claims 3 and 4 do not therefore satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

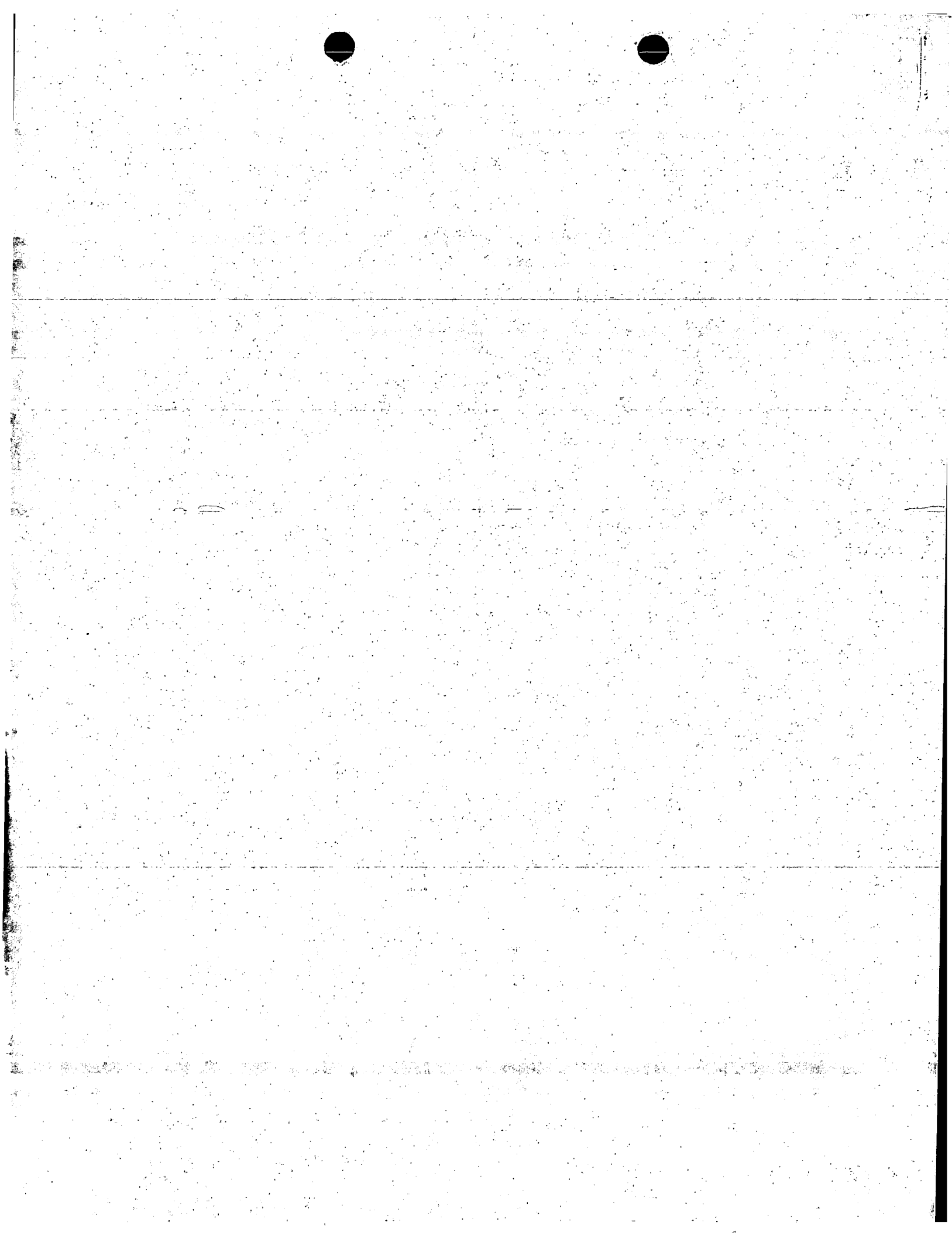




## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

7. Claim 1 lacks clarity owing to the wording "hybridizing sequence". Such an expression cannot define the subject matter for which protection is sought. This wording is very vague and imprecise and, moreover, does not provide any technical indication of the hybridization conditions. In the absence of any additional information, this wording encompasses any nucleic acid.




PCT

WIPO

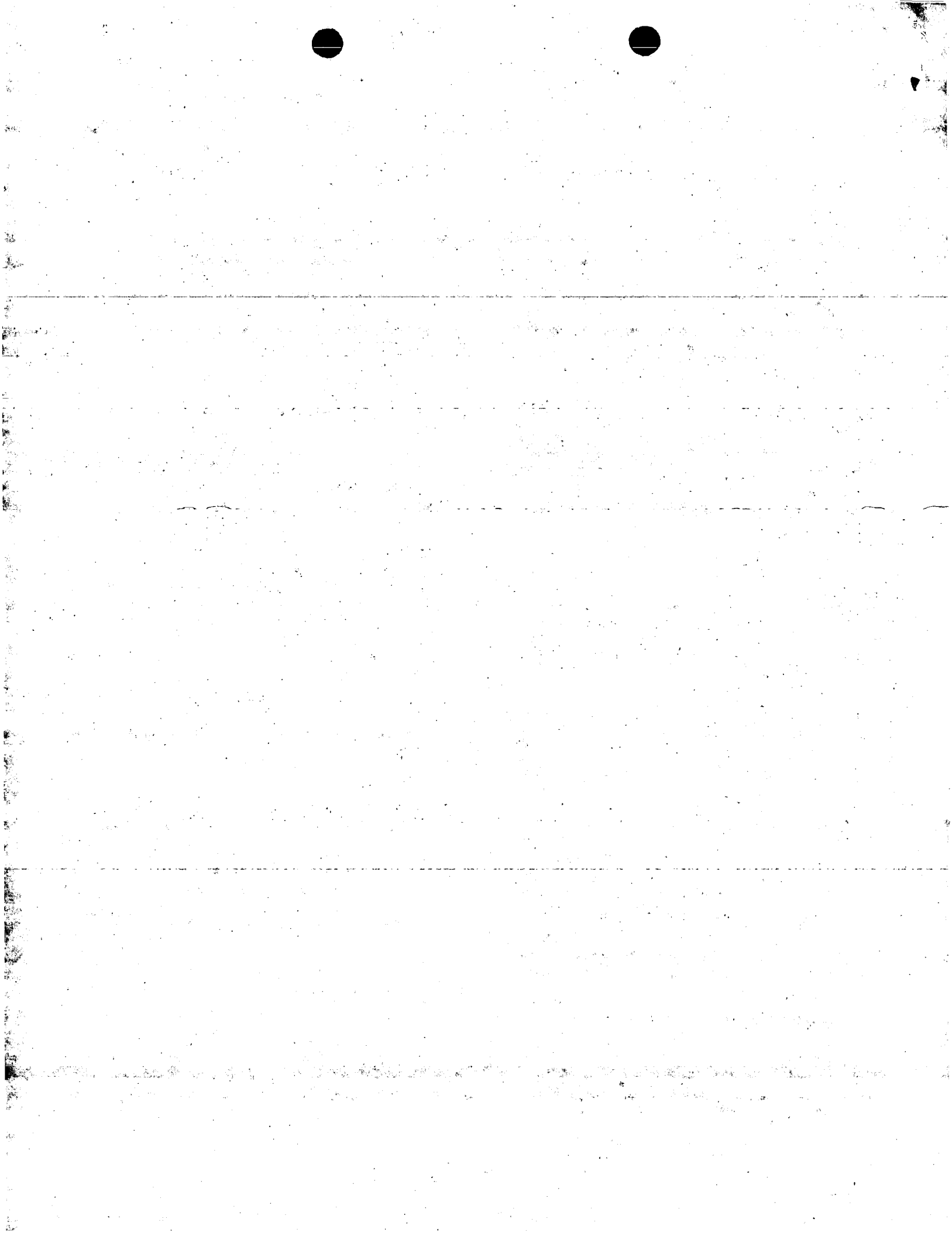
PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339386/17043	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02042	Date du dépôt international (jour/mois/année) 23/09/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 23/09/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGR. ....et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li><li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li><li>III <input checked="" type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li><li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li><li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li><li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li><li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li><li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li></ul>		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale  21/04/1999	Date d'achèvement du présent rapport  07.12.99	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:   Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé  Keller, Y  N° de téléphone +49 89 2399 7419	





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02042

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

**Description, pages:**

1-13                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-12                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/10-10/10              version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :  
☐ des revendications,    n°s :  
☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.  
☒ les revendications n°s 7, 8 and 11, 12 partielles.



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02042

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☒ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s 7, 8 and 11, 12 partialement en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :  
**voir feuille séparée**
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 4, 9-12 Non : Revendications 1-3, 5, 6
Activité inventive	Oui : Revendications 9-12 Non : Revendications 1-6
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-6, 9-12 Non : Revendications

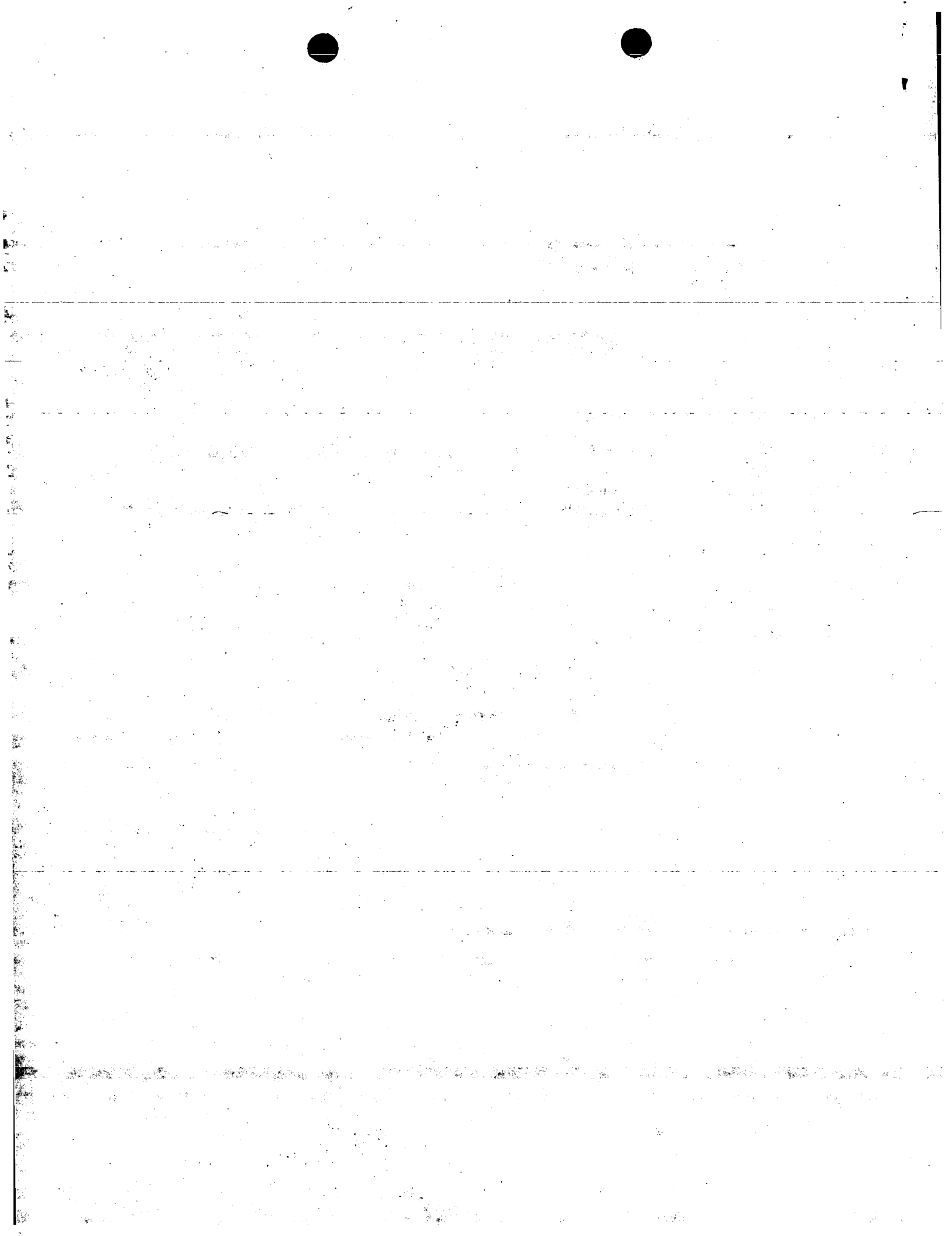
**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**





**Concernant le point III****Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

Une opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ne peut être rédigée pour les revendications 7 et 8 (ainsi que les revendications s'y référant c.a.d. partiellement 11 et 12), car celles-ci ne contiennent aucune caractéristique technique. Les revendications 7 et 8 tentent de définir cet objet par le résultat à atteindre, ce qui revient simplement à énoncer le problème fondamental que doit résoudre l'invention. Les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat et résoudre le problème doivent être ajoutées.

**Concernant le point V****Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: EMBL Database AC. N°: D 88192

D2: EMBL Database AC. N°: D 88193

D3: EMBL Database AC. N°: AB 005238

D4: WO 9616182

D5: WO 9008828

**Nouveauté**

1. Les revendications 4, 9-12 sont nouvelles car elles ne sont pas décrites dans les documents de l'art antérieur cités par le rapport de recherche.
2. Les documents D1, D2 et D3 décrivent les séquences nucléotidiques ayant respectivement 54%, 57%, 70% d'homologie avec toute ou une partie de la



séquence SEQ ID N° 3, en particulier celle s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 2111.

De plus i) un nucléotide quelconque anticipe la nouveauté des revendications 1 et 2 car une "partie" de séquence peut consister en un seul nucléotide.

ii) une séquence nucléotidique ayant 80% d'homologie avec une séquence s'hybridant à la séquence SEQ ID N°3 et/ou à une partie s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 2111 (revendication 1c et 2c) embrasse un grand nombre de séquences nucléotidiques dont certaines ne sont à l'évidence pas nouvelles (voir point VIII).

Il en découle qu'au vu de D1, D2, D3 et des points i et ii mentionnés ci-dessus, les revendications 1 et 2 ne satisfont pas aux exigences de l'Article 33(2) PCT.

3. D4 décrit une méthode d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle, par transformation d'une plante ou cellule de plante avec un vecteur comprenant un gène codant pour une substance cytotoxique et placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique du pollen de *Brassica napus* (revendications 11, 21, 43, 46). La fertilité des plantes ainsi obtenues peut être induite par croisement avec une autre lignée de plantes transgéniques qui comportent une construction annulant les effets de la substance cytotoxique de la plante présentant une stérilité mâle.
4. D5 décrit un procédé pour obtenir des plantes (p. ex. *Brassica napus*) présentant une stérilité mâle inductible ainsi que des plantes présentant ces mêmes caractéristiques. Ce procédé consiste à transformer une plante avec un vecteur comprenant un gène codant pour une substance cytotoxique placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des microspores. Cette substance cytotoxique peut être une toxine (page 21 ligne 3 à 12, revendication 10) ou un ARN "antisens", capable d'inhiber l'expression d'une protéine ayant pour effet l'interruption d'une voie de biosynthèse ou métabolite indispensable au développement des microspores (page 20, ligne 27 à page 21 ligne 2). L'inhibition peut être levée par traitement de cette plante avec une substance se trouvant normalement produite par la voie de biosynthèse en aval du lieu d'interruption (page 28 ligne 29 à page 29 ligne 3, revendication 21) ou en la croisant avec une plante transgénique qui comprend un gène annulant l'effet du gène responsable de la stérilité mâle (page 28 lignes 6 à 16).  
Etant donné que l'objet des revendications 1-3, 5 et 6 ne se limite pas à la



séquence spécifique SEQ ID No 3 et aux caractéristiques techniques tels que par exemple la stérilité gamétophytique mâle, il en résulte qu'au vu de D4 ou D5 les revendications 1-3, 5 et 6 ne satisfont pas aux conditions énoncées dans l'Article 33(2) PCT.

#### Activité inventive

5. Les revendications 9-12 font preuve d'activité inventive car il n'est pas montré dans l'art antérieur que la séquence nucléotidique SEQ ID N°. 3 en tandem avec le gène codant pour la subtilisine permet d'obtenir une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible.
6. L'objet des revendications 3 et 4 consiste uniquement en la sélection d'un gène codant pour une substance cytotoxique particulière, et l'utilisation de cette même substance dans un procédé non nouveau. Cette sélection particulière ne peut être considérée comme inventive que si celle-ci présente des effets ou propriétés surprenantes par rapport à ceux attendus par l'homme du métier. Néanmoins, cela ne semble pas être le cas.  
Les revendications 3 et 4 ne satisfont donc pas aux conditions énoncées par l'Article 33(3) PCT.

#### Concernant le point VIII

##### **Observations relatives à la demande internationale**

7. La revendication 1 manque de clarté de part la formulation "séquence s'hybridant". Une telle définition ne peut définir l'objet pour lequel la protection est recherchée. En effet, cette formulation est très vague et imprécise, et de plus ne fournit aucune indication technique sur les conditions d'hybridation. En l'absence d'indication complémentaire, cette formulation englobe n'importe quel acide nucléique.



## PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

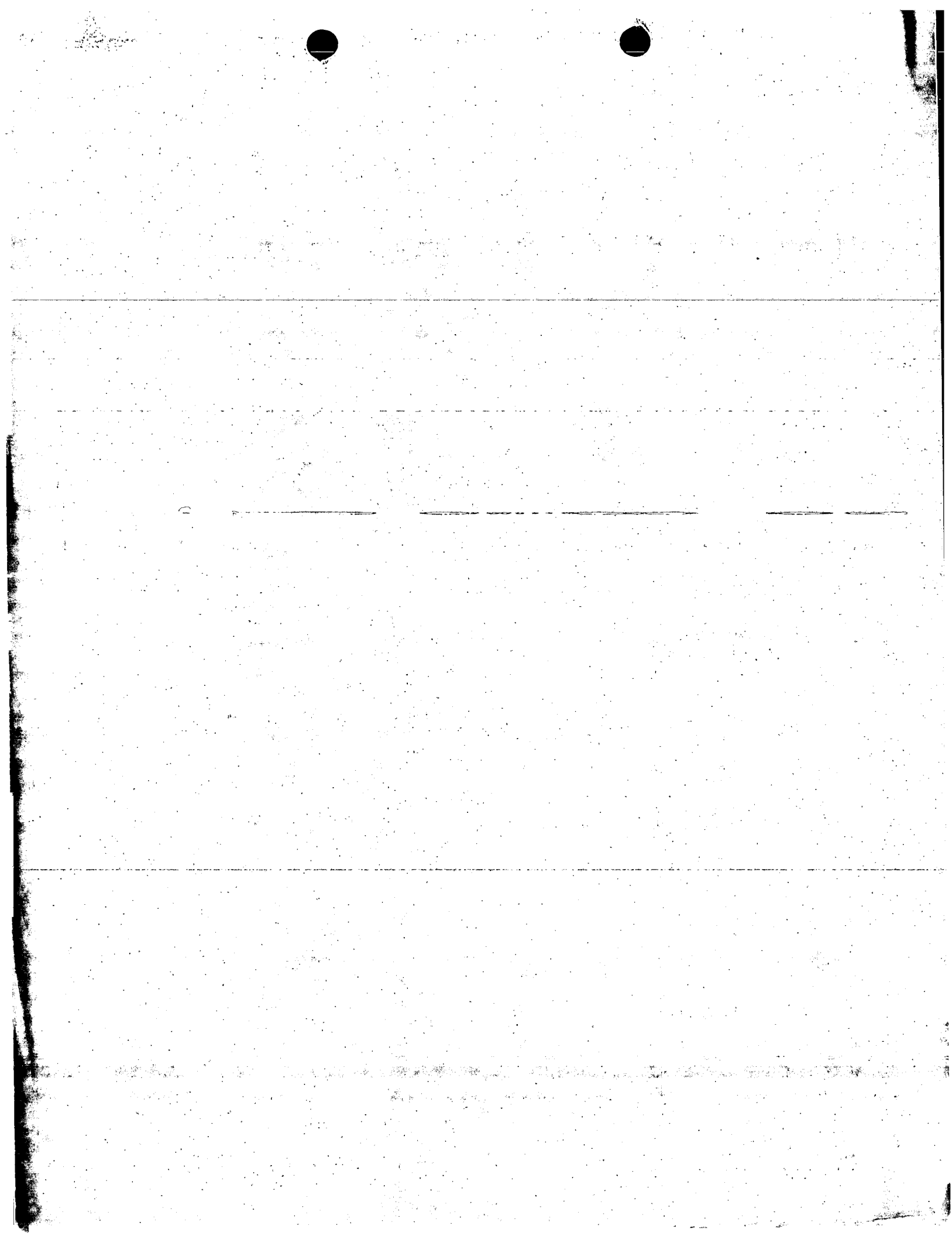
Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>339386/17043</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 98/ 02042</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>23/09/1998</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>23/09/1997</b>
Déposant  <b>INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGR. ....et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
  - ☒ déposé avec la demande internationale
  - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
    - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
  - ☐ transcrit par l'administration
4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.  
☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
5. En ce qui concerne l'abrégé,
  - ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
  - ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:
  - Figure n° — ☐ suggérée par le déposant.
  - ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
  - ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.
  - ☐ Aucune des figures n'est à publier.





## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H1/02 A01H5/00 A01H5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-locus glycoprotein, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88192, 10 juillet 1997, XP002068717 voir séquence nt 780-1560	1,2
X	SUZUKI, G., ET AL.: "Brassica rapa DNA for S-receptor kinase, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. D88193, 10 juillet 1997, XP002068718 voir séquence nt 300-1555	1,2
X	NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MKP11" EMBL SEQUENCE DATABASE ACCESSION NO. AB005238, XP002093097 voir séquence 74710-75080	1,2
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## ° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

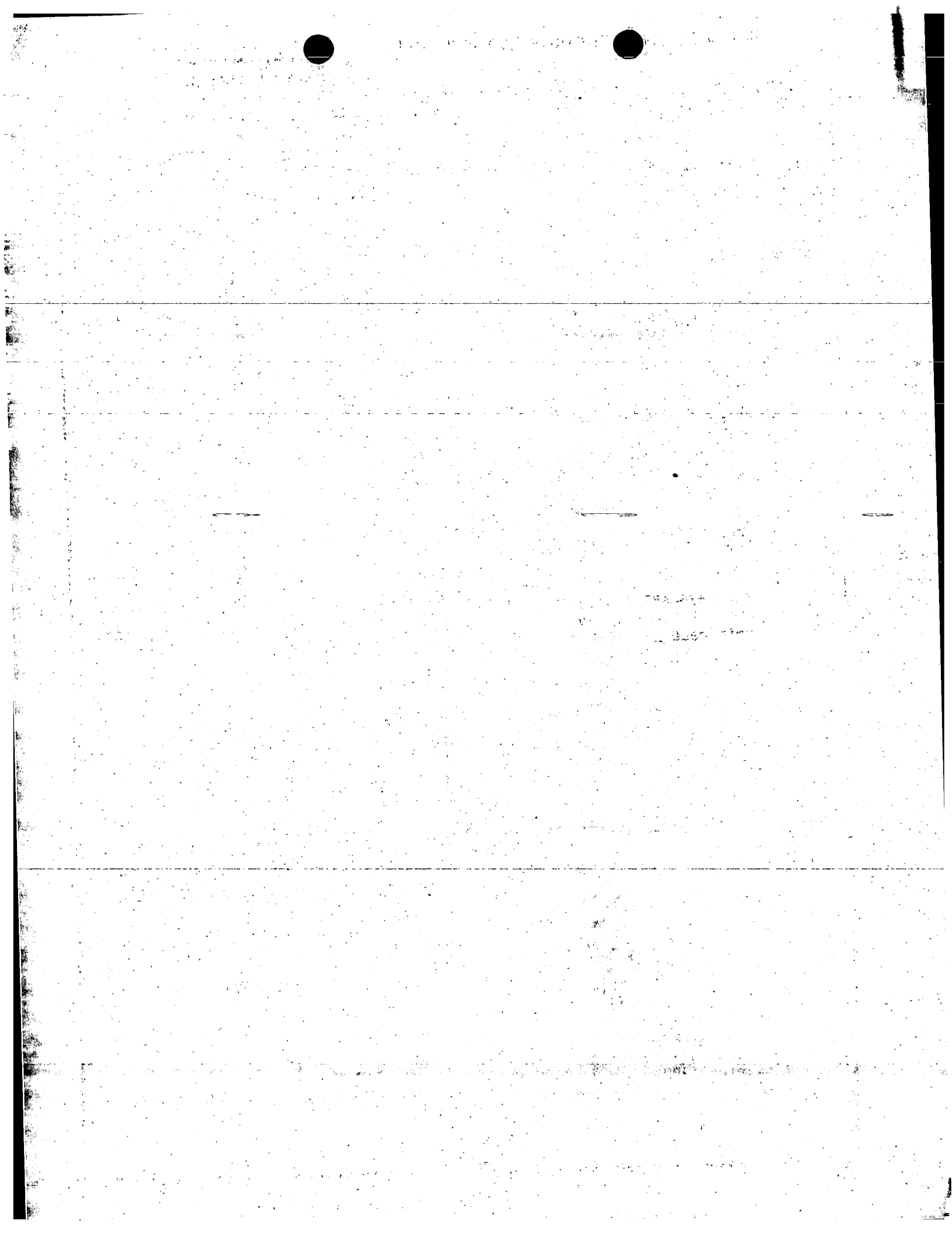
24/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

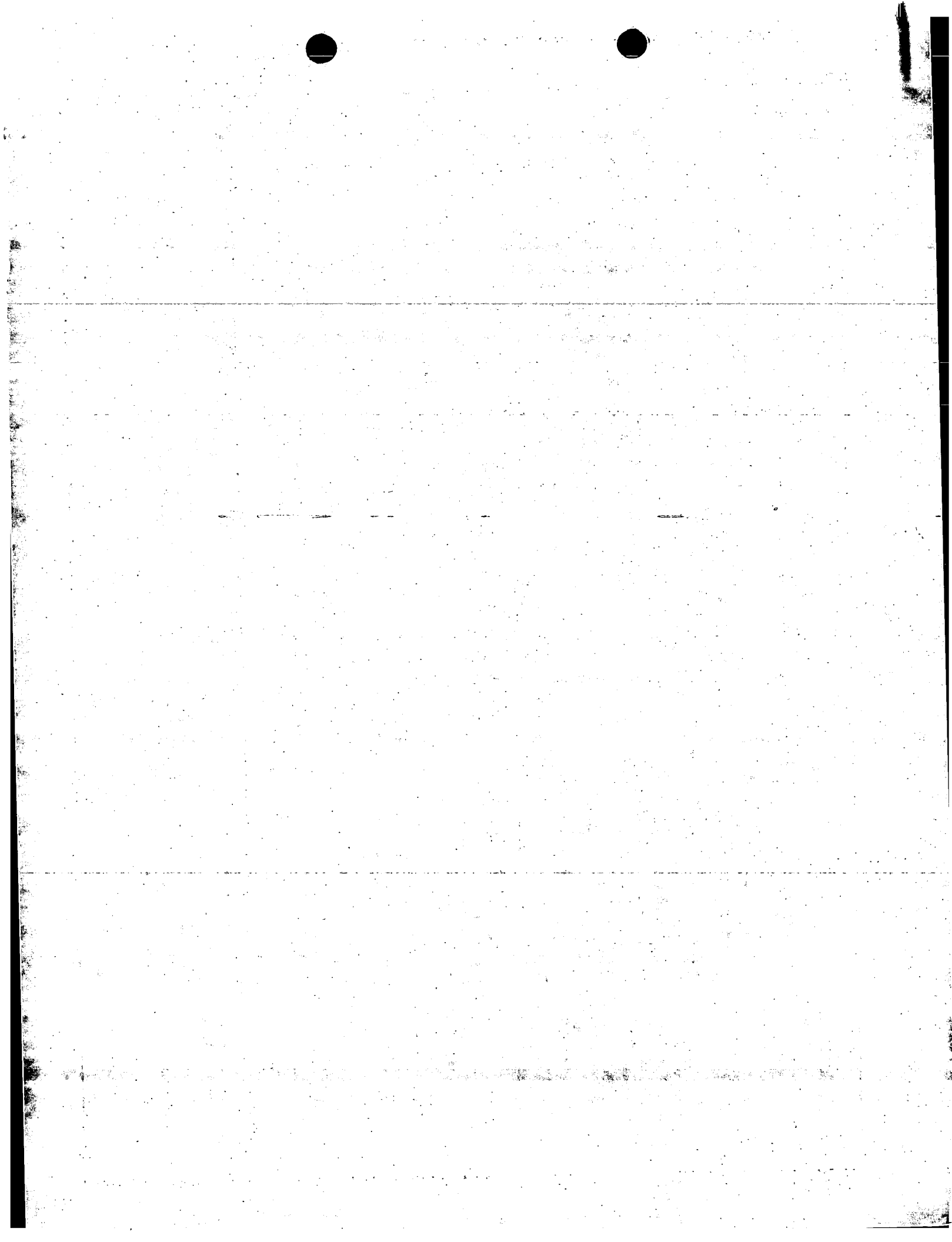
Fonctionnaire autorisé

Maddox, A



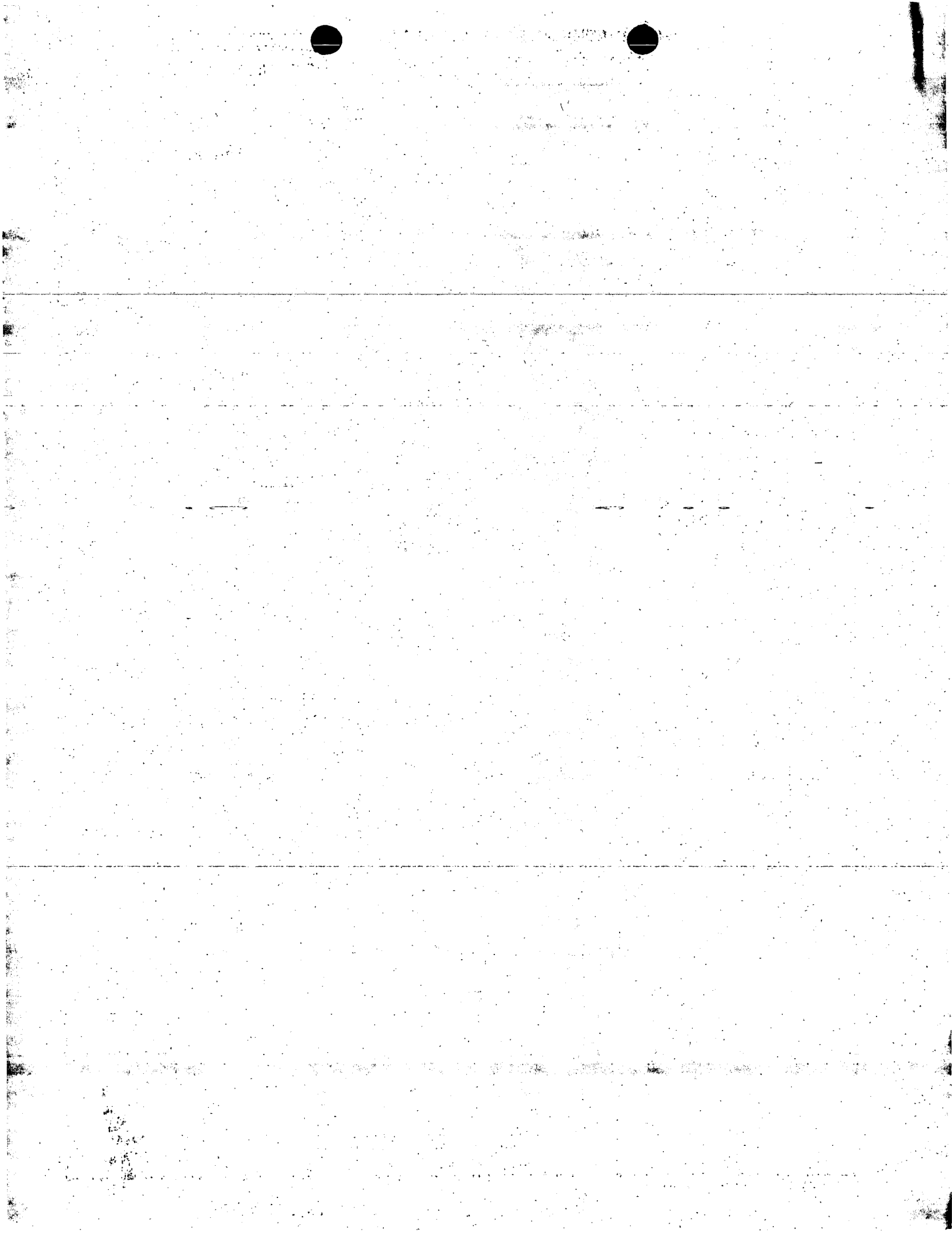
## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 16182 A (PIONEER HI BRED INT) 30 mai 1996 voir le document en entier ---	7,8,11, 12
X	WO 90 08828 A (PALADIN HYBRIDS INC) 9 août 1990 voir le document en entier ---	7,8,11, 12
X	EP 0 790 311 A (CT VOOR PLANTENVEREDELINGS EN ;UNIV NIJMEGEN (NL)) 20 août 1997 voir le document en entier ---	7,8
X	EP 0 329 308 A (PALADIN HYBRIDS INC) 23 août 1989 voir le document en entier ---	7,8
X	KANDASAMY, M.K., ET AL.: "Ablation of papillar cell function in Brassica flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination" THE PLANT CELL, vol. 5, 1993, pages 263-275, XP002067958 voir page 264, colonne de droite - page 266 ---	7,8
X	EP 0 436 467 A (CIBA GEIGY AG) 10 juillet 1991 voir page 24, ligne 45 - page 25, ligne 1 voir page 37, ligne 35 - ligne 52 voir page 26, ligne 26 - ligne 30 ---	7,8
X	WO 94 13809 A (UNIV MELBOURNE ;KNOX ROBERT BRUCE (AU); SINGH MOHAN BIR (AU); XU H) 23 juin 1994 voir exemple 13 ---	7,8
A	WO 94 25613 A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 10 novembre 1994 voir page 26, ligne 30 - page 27, ligne 27; revendications 42-44 ---	1
A	WO 92 18625 A (MOGEN INT) 29 octobre 1992 voir page 25, ligne 30 - page 26, ligne 30 ---	9
A	WO 90 08830 A (ICI PLC) 9 août 1990 voir page 10, ligne 24 - page 11, ligne 13; revendication 28; figures 1,2 ---	9
A	WO 94 21804 A (PIONEER HI BRED INT ;NEILL JOHN D (US); PIERCE DOROTHY A (US); CIG) 29 septembre 1994 voir page 16 - page 23 voir page 31 - page 32 ---	1-8
	--- -/--	



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DENIS, M., ET AL.: "Expression of engineered nuclear male sterility in Brassica napus"            PLANT PHYSIOLOGY,            vol. 101, 1993, pages 1295-1304,            XP002009916            voir le document en entier            -----</p>	12



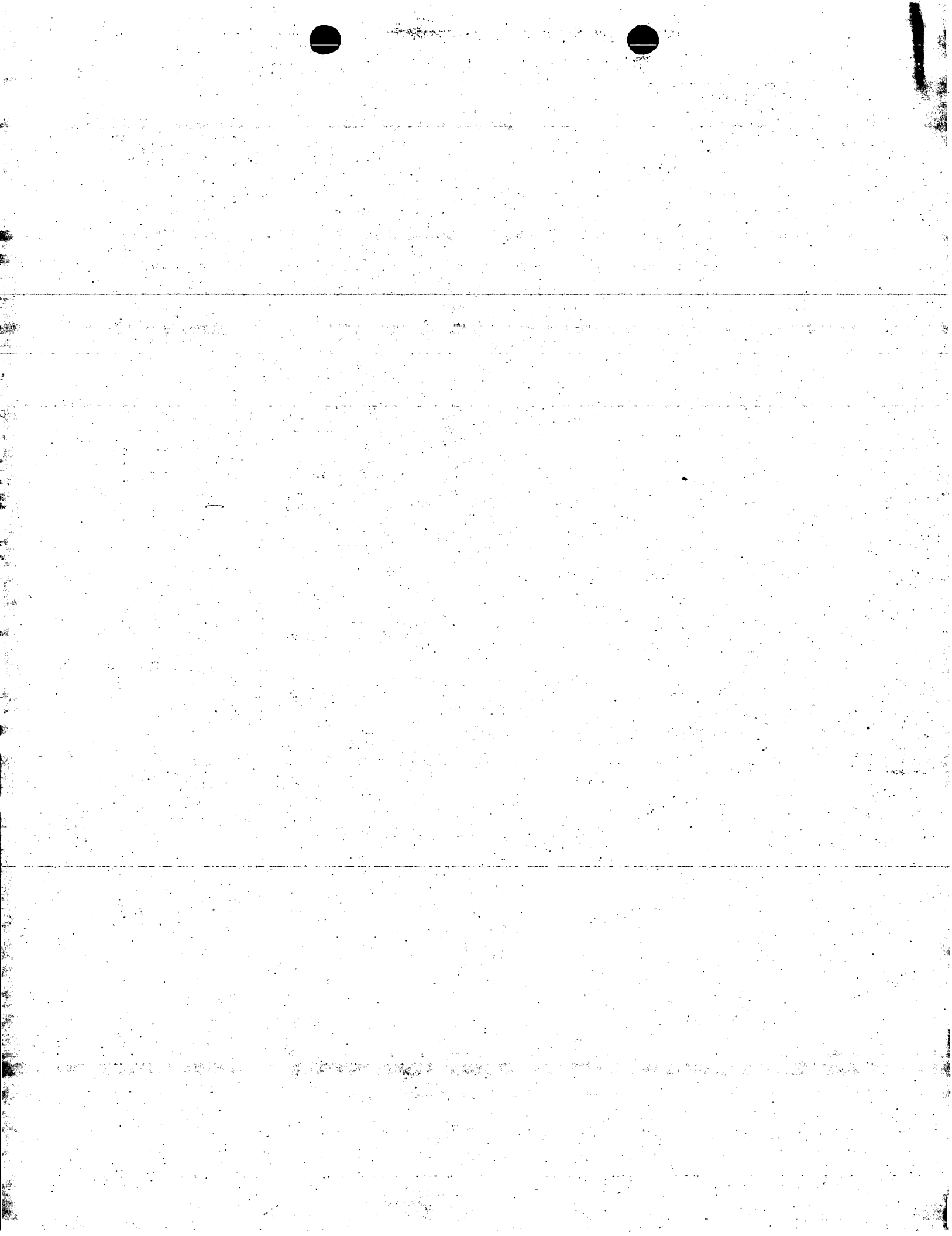
# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616182 A	30-05-1996	US 5633438 A AU 701202 B AU 4194496 A CA 2205505 A EP 0797674 A NZ 297145 A US 5756324 A	27-05-1997 21-01-1999 17-06-1996 30-05-1996 01-10-1997 25-11-1998 26-05-1998
WO 9008828 A	09-08-1990	AU 1628695 A AU 655574 B AU 5037290 A EP 0456706 A JP 9182589 A JP 4504355 T US 5728558 A US 5728926 A US 5741684 A US 5356799 A	03-08-1995 05-01-1995 24-08-1990 21-11-1991 15-07-1997 06-08-1992 17-03-1998 17-03-1998 21-04-1998 18-10-1994
EP 0790311 A	20-08-1997	AU 1676897 A WO 9730166 A	02-09-1997 21-08-1997
EP 0329308 A	23-08-1989	AU 2963289 A US 5728558 A US 5728926 A US 5741684 A US 5356799 A	03-08-1989 17-03-1998 17-03-1998 21-04-1998 18-10-1994
EP 0436467 A	10-07-1991	AU 642454 B AU 6855490 A CA 2033247 A EP 0825262 A	21-10-1993 11-07-1991 30-06-1991 25-02-1998
WO 9413809 A	23-06-1994	AU 5688994 A EP 0674711 A	04-07-1994 04-10-1995
WO 9425613 A	10-11-1994	AU 6819194 A US 5859328 A	21-11-1994 12-01-1999
WO 9218625 A	29-10-1992	AU 663871 B AU 1698992 A BR 9205894 A CA 2105592 A CZ 9302145 A EP 0513884 A HU 65482 A JP 6506595 T SK 111693 A	26-10-1995 17-11-1992 27-09-1994 17-10-1992 13-07-1994 19-11-1992 28-06-1994 28-07-1994 02-02-1994
WO 9008830 A	09-08-1990	AU 621195 B AU 4945690 A CA 2008700 A EP 0455665 A HU 215090 B JP 4504500 T US 5808034 A	05-03-1992 24-08-1990 26-07-1990 13-11-1991 28-09-1998 13-08-1992 15-09-1998
WO 9421804 A	29-09-1994	US 5583210 A	10-12-1996





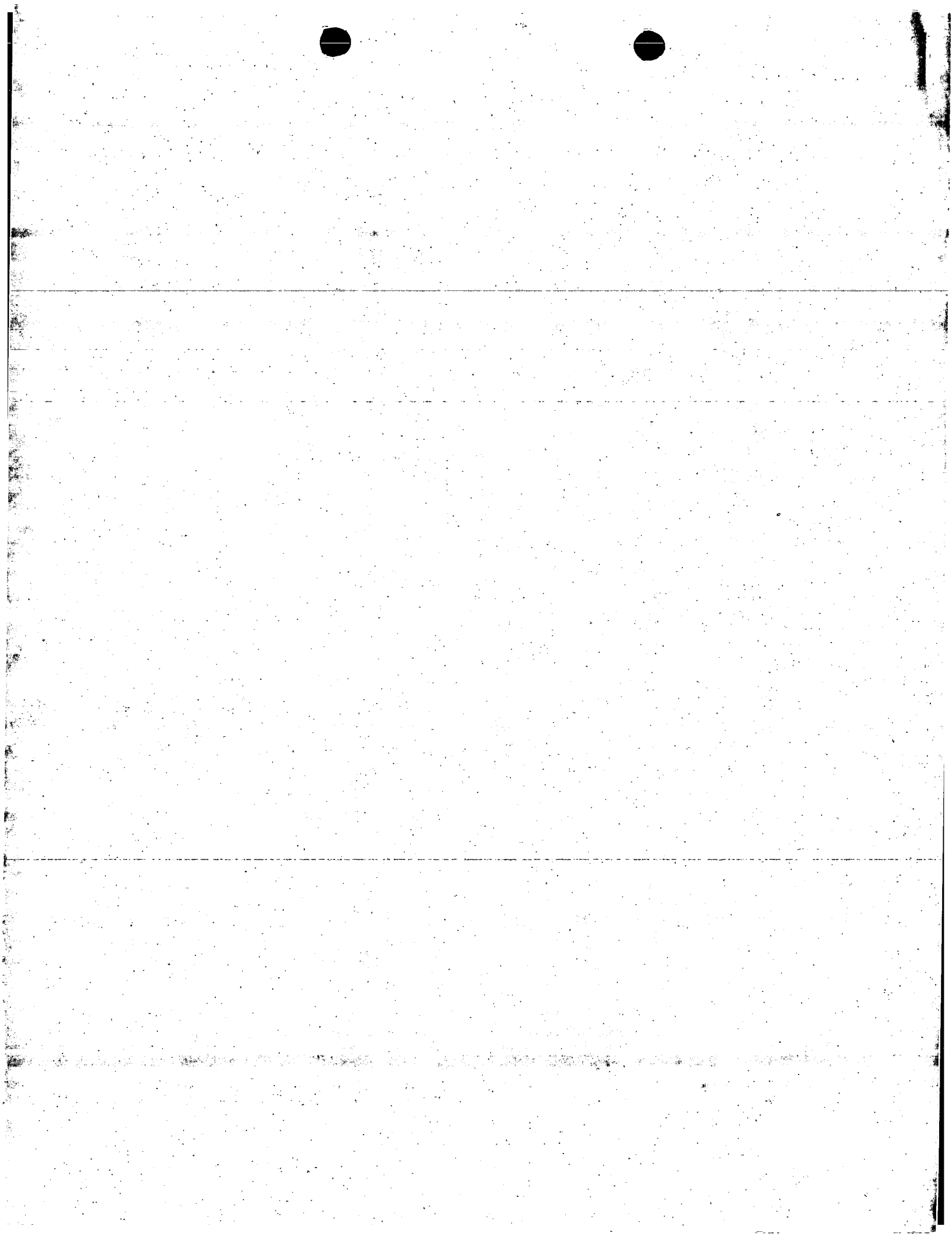
## IN NATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9421804 A		AU 5636898 A	07-05-1998
		AU 683876 B	27-11-1997
		AU 6355194 A	11-10-1994
		BR 9405950 A	19-12-1995
		CA 2158584 A	29-09-1994
		DE 4491714 T	27-06-1996
		HU 73336 A	29-07-1996
		JP 8507691 T	20-08-1996
		NL 9420020 T	01-05-1996
		NZ 263025 A	22-08-1997
		PL 310702 A	27-12-1995
		US 5760190 A	02-06-1998
		US 5728817 A	17-03-1998



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 10 juillet 1999 (10.07.99)	
Demande internationale no PCT/FR98/02042	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 338336 17043
Date du dépôt international (jour/mois/année) 23 septembre 1998 (23.09.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 23 septembre 1997 (23.09.97)
Déposant DROUAUD, Jan etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

21 avril 1999 (21.04.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé D. Barmes
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

